



# Valorisation fonctionnelle et antioxydante des épidermes de pommes Golden Delicious

Audrey Duchêne-Massias

## ► To cite this version:

Audrey Duchêne-Massias. Valorisation fonctionnelle et antioxydante des épidermes de pommes Golden Delicious. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0037 . tel-01226766

**HAL Id: tel-01226766**

**<https://theses.hal.science/tel-01226766>**

Submitted on 10 Nov 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
SPÉCIALITÉ : Chimie Physique

Par Audrey DUCHENE - MASSIAS

**Valorisation fonctionnelle et antioxydante des épidermes  
de pommes *Golden Delicious***

Sous la direction de : Pascale SUBRA-PATERNAULT  
et Fernando LEAL CALDERON

Soutenue le 20 mai 2015 à Bordeaux

Membres du jury :

Mme BARTH Danielle  
M. FERNANDEZ Xavier  
Mme FERRAND Carine  
M. TURK Mohammad  
M. BACCAUNAUD Michel

Professeur, Université de Lorraine  
Professeur, Université de Nice  
Maitre de conférence, Université de Bordeaux  
Enseignant Chercheur, Université Compiègne  
Responsable d'équipe – CRT AGROTEC

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Invité



## *Remerciements*

---

Je remercie M. Fernando Leal Calderon, Mme Pascale Subra-Paternault, M. Gilles Recour et M. Michel Baccaunaud de m'avoir accueillie dans leurs structures respectives (CBMN UMR 5248 et AGROTEC), pour avoir permis à ce travail d'exister et pour la confiance qu'ils m'ont accordée. Je vous adresse mes remerciements pour vos conseils et votre savoir faire dans vos domaines respectifs. Je tiens enfin à remercier l'ANRT, la région Aquitaine et le conseil général du Lot et Garonne pour avoir financé ce projet.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance aux différents membres du jury : à Mme Danielle Barth et M. Xavier Fernandez, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et à Mme Carine Ferrand et M. Mohammad Turk pour avoir accepté d'en être les examinateurs.

Un grand merci à mes très chers collègues François, Pierre-Jean, Sylvie, Marylin, Alexia, Romain et Isabelle, pour leur bonne humeur et soutien au quotidien, ainsi que leur conseils professionnels et personnels qui m'ont permis de tenir bon. Merci d'être là tout simplement.

Quelques mots pour Pascale, tu as toute ma reconnaissance pour l'aide que tu m'as apportée tout au long de ces trois longues années. Tu as été d'un grand soutien dans ma vie professionnelle et parfois personnelle, ce travail n'aurait pas été le même sans toi. Merci aussi pour ta disponibilité et la confiance que tu m'as accordées.

J'adresse également mes remerciements aux personnes ayant participé de près ou de loin à ce travail, notamment aux étudiants ayant permis d'approfondir quelques résultats : Alexane, Julia, Lin et Arthur, ainsi qu'à tous les membres du laboratoire CBMN. Un grand merci à Clémence et Tiphaine pour leurs rires et leur bonne humeur dans la salle supercritique. Je souhaiterais également remercier M. Abdessattar Hadj Sassi pour la partie culture cellulaire et Mlle Séverine Boisard, de l'Université d'Angers, pour son aide à l'identification des polyphénols.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille. Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement ma sœur et ma mère pour leur soutien tout au long de ma vie. Je ne vous ai jamais exprimé mon amour et ma reconnaissance, je vous dédie donc ces quelques lignes. Je vous aime. Un énorme remerciement à ma maman, pour m'avoir permis de faire des études en toute liberté et de m'avoir aidé.

A mon mari, merci d'avoir supporté ces trois ans à mes côtés et de m'avoir permis de ne pas lâcher. Pour toi Alexis, les mots ne seront pas suffisants pour exprimer ce que tu représentes pour

moi et le soutien que tu m'as apporté depuis toutes ces années. Merci d'être là, je t'aime. Je souhaite que notre vie ensemble soit la plus longue possible.

Je terminerai par une pensée pour Fouad et Ahmed, ainsi qu'à ma belle famille Eric, Nadège et Teddy. Merci pour votre bonne humeur et vos conseils dans la vie de tous les jours.

« J'ai appris que le succès ne doit pas être mesuré par la position qu'on a atteint dans la vie, mais par les obstacles qu'on a dû surmonter, tout en essayant de réussir. »

Booker T. Washington

## Tables des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>6</b>
I. LA POMME, SOURCE DE COMPOSES D'INTERET .....	7
I.1. Pommes & coproduits .....	7
I.1.1. Production de fruits et légumes en Aquitaine.....	7
I.1.2. Coproduits végétaux & valorisation .....	8
I.1.3. Cas particulier de la pomme .....	10
I.2. Polyphénols et antioxydants.....	14
I.2.1. Classes de polyphénols.....	15
a/ Les flavonoïdes .....	16
Les flavanols et proanthocyanidines .....	16
Les flavones, flavonols et flavanones .....	17
Les isoflavones et dihydrochalcones.....	18
Les anthocyanes .....	18
b/ Les acides phénoliques .....	19
c/ Les tannins, stilbènes et lignanes .....	19
I.2.2. Teneurs et variabilité des fruits et des coproduits en polyphénols .....	20
a/ Richesse de l'épiderme et par conséquent des gâteaux de presse .....	20
b/ Incidence de la variété et des conditions de culture.....	21
I.2.3. Propriétés antioxydantes des polyphénols & effet santé.....	23
a/ Activité antioxydante .....	23
b/ Effet santé .....	25
I.3. Dégradation des polyphénols par réaction enzymatique .....	26
I.3.1. Oxydation enzymatique .....	26
I.3.2. Solutions à l'oxydation.....	27
I.4. Impact des procédés de transformations agroalimentaires sur les polyphénols.....	29
Cuisson-traitements thermiques .....	30
Séchage- déshydratation .....	31
Stockage – conservation.....	32
II. EXTRACTION DES POLYPHENOLS : TECHNIQUES CONVENTIONNELLES & CO <sub>2</sub> .....	34
II.1. Extraction par solvants .....	34
II.2. Méthodes physiques .....	36
II.3. CO <sub>2</sub> supercritique .....	37
II.3.1. Domaine supercritique et propriétés .....	37
II.3.2. Avantages, inconvénients & aspect économique du CO <sub>2</sub> supercritique .....	40
II.3.3. Exemples d'extraction par fluides supercritiques.....	42
III. UTILISATION DES MATERIAUX DE PLANTES DANS LES EMULSIONS .....	45
III.1. Généralités sur les émulsions .....	45
III.2. Emulsions de Pickering .....	47
III.2.1. Angle de contact & énergie d'ancrage.....	48
III.2.2 Règle empirique de Finkle .....	49

III.2.3. Structure des interfaces .....	50
III.2.4. Emulsions de Pickering obtenues à partir de particules d'origine biologique .....	51
IV. CONCLUSION A L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	54
<b>CHAPITRE B. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>57</b>
<b>1<sup>ERE</sup> PARTIE : PREPARATION DES ECHANTILLONS.....</b>	<b>58</b>
I. MATERIEL PREMIERE : DE LA POMME FRAICHE A LA POUDRE LYOPHILISEE.....	59
I.1. Pommes Golden Delicious .....	59
I.2. Lyophilisation.....	59
I.3. Blanchiment.....	61
I.4. Réhydratation des poudres lyophilisées .....	61
I.5. Récapitulatif des échantillons de pommes.....	62
II. EXTRACTION DES POLYPHENOLS .....	63
II.1. Macération.....	63
II.2. Extraction par CO <sub>2</sub> supercritique .....	64
II.2.1. Dispositif.....	64
II.2.2. Collecte des fractions.....	65
III. PROTOCOLES DE PREPARATION DES EMULSIONS .....	67
III.1. Emulsions de pommes.....	68
III.2. Emulsions de cacao délipidé .....	68
<b>2<sup>EME</sup> PARTIE : CARACTERISATION .....</b>	<b>70</b>
I. ACTIVITE ANTIOXYDANTE .....	71
II. QUANTIFICATION DES POLYPHENOLS TOTAUX .....	73
III. IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DE POLYPHENOLS PAR CLHP .....	74
III.1. Méthode .....	74
III.2. Identification par spectrométrie de masse.....	74
III.3. Quantification par CLHP .....	76
IV. ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE.....	77
IV.1. Matériel biologique et conditions de culture .....	77
IV.2. Préparation des échantillons à tester .....	78
IV.3. Suivi de la prolifération et de la viabilité cellulaire .....	79
IV.4. Détermination du « mode d'action » des extraits sur les cellules HT-29.....	79
V. CARACTERISATION DES EMULSIONS .....	81
V.1. Microscopie optique.....	81
V.2. Granulométrie laser .....	81
<b>CHAPITRE C. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>85</b>
<b>INCIDENCE DES PRETRAITEMENTS SUR LA PRESERVATION DES</b>	
<b>ANTIOXYDANTS D'EPIDERMES DE POMMES GOLDEN DELICIOUS.....</b>	<b>86</b>
I.PREPARATION DES ECHANTILLONS POMMES ET EFFET SUR LA CAPACITE ANTIOXYDANTE DES	
EPIDERMES.....	87
I.1. Broyage des épidermes frais de pommes .....	87
I.2. Lyophilisation des épidermes frais de pommes.....	89
II. INACTIVATION DES ENZYMES RESPONSABLES DU BRUNISSEMENT SANS DEGRADATION DES	
POLYPHENOLS.....	90
II.1. Réhydratation des poudres et brunissement enzymatique .....	90

II.2. Adjuvants naturels.....	92
II.2.1. Ajout de poudre de fraises .....	93
II.2.2. Ajout de jus de fruits .....	94
II.3. Traitement thermique.....	96
III. CONCLUSION SUR L'INCIDENCE DES PRETRAITEMENTS SUR LA PRESERVATION DES ANTIOXYDANTS .....	99
<b>VALORISATION DES COPRODUITS VEGETAUX EN TANT QU'AGENT EMULSIFIANT.....</b>	<b>102</b>
I. EMULSIONS A BASE DE POUDRE DE POMME .....	104
I.1. Emulsions à base de broyat de pomme entière et influence de l'extrait sec total.....	104
I.2. Tests d'émulsification sur diverses fractions de pommes.....	107
I.2.2. Influence de la dépectination sur la pomme entière Golden Delicious.....	109
I.2.3. Comparaison du pouvoir émulsionnant du jus, du parenchyme de l'épiderme .....	109
I.2.4. Comportement en émulsion de poudres de pommes traitées en CO <sub>2</sub> supercritique....	111
a/ Impact du temps de contact de la matrice pomme avec le fluide extractant CO <sub>2</sub> +EtOH supercritique.....	111
b/ Autres conditions d'extraction.....	113
I.2.5. Comportement en émulsion de poudres d'épidermes blanchies et non blanchies .....	115
a / influence de la quantité de poudre .....	115
b/ Ajout d'acide alginique sur la stabilité de l'émulsion .....	116
I.3. Conclusion sur la stabilisation des émulsions avec des solides dérivés de pommes ....	119
II. EMULSIONS A BASE DE CACAO.....	121
II.1. Lavage des poudres.....	121
II.2. Impact de la quantité de matière sèche incorporée dans la phase aqueuse .....	123
II.3. Impact de la phase de dispersion initiale.....	126
II.4. Réduction de la taille des gouttes par ajout d'un épaississant dans la phase aqueuse	127
III. CONCLUSIONS SUR LES PROPRIETES EMULSIFIANTES DES VEGETAUX.....	130
<b>EXTRACTION DES POLYPHENOLS DE POMMES PAR LA TECHNOLOGIE CO<sub>2</sub> SUPERCRITIQUE.....</b>	<b>132</b>
I. EXTRACTION PAR CO <sub>2</sub> +COSOLVANT DES POLYPHENOLS A PARTIR D'EPIDERMES DE POMMES..	136
I.1. Reproductibilité des extractions :.....	136
I.1.1. Protocole statique.....	136
I.1.2. Protocole dynamique.....	140
I.2. Influence du protocole dynamique ou statique.....	142
I.3. Influence de la masse d'épiderme chargée dans le réacteur .....	151
I.4. Influence de la préparation de la poudre de pommes .....	158
I.4.1. Broyage des épidermes de pommes.....	158
I.4.2. Blanchiment de la matière première .....	163
I.5. Influence de la température et de la composition du fluide .....	169
I.5.1. Diagrammes de phases des mélanges CO <sub>2</sub> +éthanol+eau .....	170
a/ Température 50 °C, Pression 25 MPa.....	170
b/ Température 28 °C, Pression 25 MPa.....	170
I.5.2. Effet de la température à composition constante de fluide extractant .....	172
I.5.3. Effet de la composition du fluide extractant à 50 °C et 28 °C .....	178
I.5.4. Influence de la polarité du solvant .....	187



---

<i>I.6. Conclusions sur l'impact des paramètres d'extraction supercritique sur la composition et la quantité des extraits obtenus</i> .....	190
<b>II. EXTRAITS ISSUS DE POMMES BIOLOGIQUES ET ACTIVITE ANTIPROLIFERATIVE</b> .....	192
<i>II.1. Composition en polyphénols et activité antioxydante des extraits issus de pommes biologiques</i> .....	192
<i>II.2. Activité antiproliférative des extraits de pommes biologiques</i> .....	194
<b>III. CARACTERISATION DES RESIDUS CO<sub>2</sub> SUPERCRITIQUES</b> .....	200
<i>III.1. Composition en polyphénols et en sucres des résidus FSC</i> .....	200
<i>III.2. Activité de l'enzyme PPO</i> .....	202
<b>IV. CONCLUSION A L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS PAR TECHNIQUE CO<sub>2</sub></b> .....	204
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	206
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	212
<b>ANNEXES</b> .....	232
ANNEXE 1. DROITES ETALONS .....	232
ANNEXE 2. COURBES D'EXTRACTION DES POLYPHENOLS EN FSC .....	234
1. INFLUENCE DE LA MASSE D'EPIDERMES CHARGEE DANS LE REACTEUR. ....	234
2. BROYAGE DES EPIDERMES.....	236
3. BLANCHIMENT DES MATRICES. ....	238
4. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE. ....	240
5. INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU FLUIDE A 50 °C. ....	242
6. INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU FLUIDE A 28 °C. ....	244
7. INFLUENCE DE LA TENEUR EN CO <sub>2</sub> (MODE DYNAMIQUE). ....	246
ANNEXE 3. COMMUNICATION SCIENTIFIQUES.....	248

## *Liste des Tableaux et Figures*

### *Liste des Tableaux*

<u>Tableau 1</u> : Répartition des productions fruitières et légumières par départements aquitains [...]	8
<u>Tableau 2</u> : Composition nutritionnelle de la pomme. ....	11
<u>Tableau 3</u> : Récapitulatif des classes de polyphénols présents dans les fruits et légumes [...]	14
<u>Tableau 4</u> : Composition en polyphénols de la pomme fraîche .....	15
<u>Tableau 5</u> : Présentation des polyphénols de plusieurs variétés de pommes .....	22
<u>Tableau 6</u> : Composition en polyphénols de variétés de pomme. ....	22
<u>Tableau 7</u> : Quantité de polyphénols totaux dans différentes variétés de pommes .....	22
<u>Tableau 8</u> : Solvants organiques utilisés dans l'extraction des polyphénols .....	35
<u>Tableau 9</u> : Exemples de paramètres d'EFS de matrices végétales.....	43
<u>Tableau 10</u> : Dimensions caractéristiques de l'axe Ultra-turrax® utilisé .....	67
<u>Tableau 11</u> : Quelques avantages et inconvénients des méthodes de mesure ORAC et TEAC.....	71
<u>Tableau 12</u> : Polyphénols identifiés de l'épiderme de pommes par couplage CLHP et SM.....	76
<u>Tableau 13</u> : Composition de la phase mobile [...]	76
<u>Tableau 14</u> : Récapitulatif des méthodes utilisées pour caractériser les profils de polyphénols....	77
<u>Tableau 15</u> : Variation du pourcentage d'incorporation d'extrait sec dans une émulsion [...]	105
<u>Tableau 16</u> : Paramètres des EFS dont les résidus testés sont issus. ....	113
<u>Tableau 17</u> : Augmentation du pourcentage massique de poudres d'épidermes [...]	115
<u>Tableau 18</u> : Augmentation du pourcentage massique d'acide alginique [...]	116
<u>Tableau 19</u> : Récapitulatif des essais et paramètres des extractions réalisées par CO <sub>2</sub> .....	135
<u>Tableau 20</u> : Moyennes et écarts types des masses extraites F0 à F5 - EFS 13 et EFS 14 .....	137
<u>Tableau 21</u> : Moyenne et écart type des masses extraites F0 à F9 de EFS 9 et EFS 11.....	141
<u>Tableau 22</u> : Rendement des composés phénoliques extraits [...]	146
<u>Tableau 23</u> : Descriptif des extractions réalisées dans l'influence de la masse chargée .....	151
<u>Tableau 24</u> : Rendement des composés phénoliques extraits pour chacune des conditions .....	155
<u>Tableau 25</u> : Paramètres des essais EFS réalisés pour l'influence du broyage des épidermes. ...	158
<u>Tableau 26</u> : Rendement des composés phénoliques extraits [...]	160
<u>Tableau 27</u> : Paramètres des extractions 'impact du blanchiment' .....	163
<u>Tableau 28</u> : Rendement global d'extraction et quantités des polyphénols extraits [...]	166
<u>Tableau 29</u> : Effet de la température d'extraction .....	172
<u>Tableau 30</u> : Rendement des composés phénoliques extraits [...]	176
<u>Tableau 31</u> : Paramètres EFS dans l'effet de la température d'extraction .....	179
<u>Tableau 32</u> : Paramètres EFS dans l'effet de la polarité du solvant .....	187
<u>Tableau 33</u> : Dosages des sucres sur les matières premières épidermes [...]	201
<u>Tableau 34</u> : Paramètres des extractions EFS 15 et EFS 27 .....	202

### *Liste des Figures*

Figure 1 : Répartition de la production fruitière aquitaine en 2009. ....	7
Figure 2 : Volume du marché et valeur ajoutée des coproduits. ....	10
Figure 3 : Structure d'une pomme.....	11

Figure 4 : Etapes de fabrication de jus de pommes. ....	12
Figure 5 : Structure générale des flavonoïdes. ....	16
Figure 6 : Les catéchines de la pomme. ....	17
Figure 7 : Structure générale des proanthocyanidines.....	17
Figure 8 : Les flavonols de la pomme. ....	18
Figure 9 : Les dihydrochalcones de la pomme.....	18
Figure 10 : Les anthocyanes de la pomme. ....	19
Figure 12 : Les esters hydroxycinnamiques de la pomme. ....	19
Figure 13 : Mode d'action des antioxydants par transfert d'un atome d'hydrogène.....	24
Figure 14: Mode d'action des antioxydants par transfert d'électron.....	24
Figure 15 : Représentation schématique des processus de brunissement [...]. ....	27
Figure 16 : Diagramme d'état du CO <sub>2</sub> pur, précisant le domaine supercritique [...]. ....	38
Figure 17 : Variation des propriétés physicochimiques du CO <sub>2</sub> [...]. ....	38
Figure 18 : Solubilisation de deux polyphénols dans CO <sub>2</sub> +Ethanol [...]. ....	40
Figure 19: Mécanismes de stabilisation des émulsions .....	46
Figure 20: Différents types d'émulsion. ....	47
Figure 21. Configuration d'une particule sphérique adsorbée sur une interface [...]. ....	48
Figure 22. Evolution de l'énergie nécessaire pour désorber une particule sphérique [...]. ....	49
Figure 23. Cliché de microscopie optique d'une émulsion de myristate d'isopropyle [...]. ....	51
Figure 24 : Exemples d'émulsions de Pickering [...]. ....	52
Figure 25: Pomme <i>Golden Delicious</i> . ....	59
Figure 26: Peleur de pommes. ....	59
Figure 27: Courbe de tension de vapeur d'eau.....	60
Figure 28: Système colorimétrique CIELab.....	62
Figure 30: Schéma général du dispositif de macération.....	63
Figure 31: Schéma général du dispositif EFS. ....	65
Figure 32: Disposition du lit de pommes et de billes dans le réacteur. ....	65
Figure 33: Fractions collectées.....	65
Figure 34: Matière première avant extraction. ....	65
Figure 35: Axe de l'Ultra-turrax <sup>®</sup> [...], Principe de dispersion des gouttes. ....	68
Figure 36 : Lavage de la poudre avec 14 centrifugations.....	69
Figure 37 : Réaction du radical ABTS en présence d'un composé antioxydant [...]. ....	72
Figure 38: Superposition des profils polyphénoliques des extraits EFS par TIC-MS et UV [...]. ....	75
Figure 39: Identification des polyphénols par CLHP à 280 nm.....	75
Figure 40: Schéma de principe d'une expérience de diffusion statique de la lumière. ....	82
Figure 41: Aspect macroscopique des émulsions à base de poudre de cacao [...]. ....	83
Figure 42 : Impact d'un broyage au blender de 1 min + homogénéisation [...]. ....	88
Figure 43 : Impact de la lyophilisation d'épidermes frais de pommes <i>Golden</i> [...]. ....	89
Figure 44: Suivi des paramètres L* et a* et mise en évidence du brunissement .....	91
Figure 45: Evolution des broyats de pommes dans différentes matrices liquides à J4. ....	92
Figure 46: Suivi sur 48 heures des paramètres L* et a* d'un mélange de poudres [...]. ....	94
Figure 47: Suivi sur 48 heures des paramètres L* et a* d'un mélange de poudre [...]. ....	95
Figure 48 : Evolution des paramètres de couleur L* et a* [...]. ....	96
Figure 49: Evolution du mélange de la poudre de pommes et jus de citron après 48 h. ....	96
Figure 50 : Evolution de la capacité antioxydante des échantillons [...]. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 51 : Evolution des paramètres L* et a* de tranches de pommes blanchies [...]. ....	97

Figure 52: Suivi des paramètres $L^*$ et $a^*$ de tranches de pommes lyophilisées [...]	98
Figure 53 : Suivi des paramètres $L^*$ et $a^*$ d'épidermes de pommes blanchies [...]	98
Figure 54 : Evolution des paramètres $L^*$ et $a^*$ d'échantillons de pommes blanchies [...]	99
Figure 55: Impact du temps de blanchiment 80 °C 20 min sur la capacité antioxydante [...]	
	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 56 : Image de microscopie optique d'une émulsion à 20 % d'extrait sec [...]	105
Figure 57 : Comparaison des émulsions issues d'une poudre de pomme entière lavée [...]	108
Figure 58 : Emulsions issue d'une poudre de pomme entière lavée à l'éthanol. ....	108
Figure 59 : Comparaison des émulsions issues d'une poudre de pomme entière [...]	109
Figure 60 : Emulsions issues de différentes fractions de pommes. ....	111
Figure 61 : Emulsions obtenues avec les résidus des extractions par fluides supercritiques. ....	113
Figure 62 : Evolution des échantillons EFS 11, EFS 12, EFS 25 et EFS 29 de J0 à J6. ....	114
Figure 63 : Evolution de l'échantillon EFS 11 à J10. ....	114
Figure 64 : Phase aqueuse contenant 5 %m de poudre EFS 11 à J1. ....	114
Figure 65 : Matrices Pommes Conventionnelles ou Blanchies [...]	115
Figure 66 : Matrices Pommes Conventionnelles et Pommes Blanchies [...]	117
Figure 67: Images montrant l'aspect microscopique des émulsions [...]	118
Figure 68 : Aspect des phases surnageantes aqueuses à l'issue de la centrifugation. ....	122
Figure 69 : Image microscopique et distribution granulométrique d'émulsion [...]	122
Figure 70: Images montrant l'aspect microscopique et macroscopique des émulsions [...]	125
Figure 71: Image de microscopie optique d'une émulsion dont l'extrait sec est 2,5 %. ....	126
Figure 72: Emulsion n'ayant pas subi de cisaillement mécanique. ....	126
Figure 73: Emulsions fabriquées à 5 % de poudre de cacao [...]	126
Figure 74 : Emulsions obtenues après avoir dispersé la poudre de cacao dans l'huile [...]	127
Figure 75: Images montrant l'aspect microscopique des émulsions [...]	129
Figure 76 : Profils de viscosité des émulsions [...]	130
Figure 77 : Masse extraite dans chaque fraction de F0 à F5 - EFS 13 et EFS 14 [...]	137
Figure 78: Moyenne de la masse extraite dans les fractions F0 à F5 – EFS 13 et EFS 14 [...]	137
Figure 79: Masse extraite moyenne cumulée des fractions F0 à F5 – EFS 13 et EFS 14 [...]	137
Figure 80 : Profil phénolique à 280 nm des fractions F3 des deux extractions [...]	138
Figure 81 : Masses extraites cumulées des 9 polyphénols pour EFS 13 et EFS 14 [...]	139
Figure 82: Masse extraite des fractions F0 à F9 pour EFS 9 et EFS 11 [...]	141
Figure 83: Masse extraite cumulée des EFS 9 et 11, en fonction de la masse de CO <sub>2</sub> +EtOH.....	141
Figure 84: Masse moyenne cumulée des fractions F0 à F9 – EFS 9/ 11 [...]	141
Figure 85 : Quantité extraite cumulée globale obtenus par EFS 9/11 .....	142
Figure 86 : Quantité de chaque polyphénol dans les fractions collectées durant EFS 13/14 .....	143
Figure 87 : Quantité de chaque polyphénol dans les fractions collectées durant EFS 9/11 .....	144
Figure 88 : Quantités extraites cumulées (en mg) des polyphénols obtenue par EFS 9/11 .....	145
Figure 89 : Capacité antioxydante exprimée en équivalent acide ascorbique .....	148
Figure 90 : Quantité de polyphénols en mg/g d'extrait.....	148
Figure 91 : Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols .....	149
Figure 92 : Tests de corrélation entre la capacité antioxydante [...]	150
Figure 93 : Effet de la quantité de matrice chargée sur la quantité globale [...]	152
Figure 94 : Quantité de chaque polyphénol dans les fractions collectées durant EFS 19 .....	152
Figure 95: Quantité de chaque polyphénol dans les fractions collectées durant EFS 15 .....	152
Figure 96 : Quantité extraite de chaque polyphénol en fonction de la charge traitée [...]	154
Figure 97 : Cinétique normalisée d'extraction des polyphénols à 25 MPa .....	156

Figure 98: Capacité antioxydante exprimée en équivalent acide ascorbique .....	156
Figure 99: Quantité de polyphénols .....	157
Figure 100 : Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur de polyphénols .....	157
Figure 101 : Tests de corrélation entre la capacité antioxydante [...].....	158
Figure 102 : Quantités de polyphénols totaux obtenues par mesure CLHP [...].....	159
Figure 104 : Influence du broyage sur les masses globales extraites cumulées .....	160
Figure 105 : Masses extraites cumulées de chacun des polyphénols [...]. .....	161
Figure 106 : Cinétiques normalisées d'extraction de deux polyphénols [...]. .....	163
Figure 107 : Quantité de chaque polyphénol dans les fractions collectées EFS 27 [...]. .....	164
Figure 108 : Quantité de chaque polyphénol dans les fractions collectées EFS 28 [...]. .....	164
Figure 109 : Masse extraite globale .....	165
Figure 110 : Masses extraites cumulées des polyphénols .....	167
Figure 111 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols .....	168
Figure 112 : Capacité antioxydante exprimée en équivalent acide ascorbique [...] .....	168
Figure 113 : Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols [...] .....	169
Figure 114 : Tests de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur [...].....	169
Figure 115 : Diagrammes de phases CO <sub>2</sub> +EtOH+H <sub>2</sub> O .....	171
Figure 116 : Effet de la température sur la masse extraite totale en statique .....	173
Figure 117 : Effet de la température sur la masse extraite totale en dynamique .....	173
Figure 118 : Quantités cumulées des polyphénols obtenus par EFS à 28 °C ou 50 °C [...]. .....	175
Figure 119 : Cinétique normalisée d'extraction des polyphénols obtenus par EFS [...]. .....	176
Figure 120: Capacité antioxydante d'extrait pour chacune des fractions extraites en EFS .....	177
Figure 121 : Quantité de polyphénols totaux d'extrait pour chacune des fractions [...] .....	177
Figure 122 : Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols [...] .....	178
Figure 123 : Effet de la composition du fluide extractant sur la masse extraite à 50 °C . .....	180
Figure 124 : Effet de la composition du fluide extractant sur la masse extraite à 29 °C . .....	180
Figure 125 : Courbes d'extraction des polyphénols à différentes compositions [...] .....	181
Figure 126 : Courbes d'extraction des polyphénols à différentes compositions [...]. .....	182
Figure 127 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols [...] .....	183
Figure 128 : Cinétique normalisées d'extraction des polyphénols [...] .....	183
Figure 129: Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols [...] .....	186
Figure 130 : Tests de corrélation entre la capacité antioxydante [...].....	187
Figure 131 : Effet de la polarité du fluide sur la masse extraite cumulée à 50 °C . .....	188
Figure 132 : Effet de la teneur en CO <sub>2</sub> du fluide sur la masse extraite cumulée [...] .....	189
Figure 133 : Cinétique d'extraction des polyphénols à 50 °C .....	189
Figure 134: Masse extraite globale cumulée en fonction de la masse de fluide extractant.....	193
Figure 135: Profil polyphénolique des fractions collectées en EFS 16.....	193
Figure 136 : Capacité antioxydante d'extrait pour chacune des fractions extraites en EFS 16. ..	193
Figure 137: Tests de corrélation entre la capacité antioxydante [...].....	194
Figure 138 : Densité optique à 48 h après ajout des différentes concentrations de EFS 16-F3... ..	195
Figure 139 : Pourcentage d'inhibition de l'activité cellulaire [...]. .....	196
Figure 140 : Observation microscopique des cellules après inoculation [...].....	197
Figure 141 : Coloration TUNEL.. .....	197
Figure 142: La coloration de Hoechst.. .....	198
Figure 143 : Coloration de l'actine F. ....	198
Figure 144 : Quantité de polyphénols totaux des résidus FSC en fonction des lots [...].....	200
Figure 145 : Evolution des paramètres de couleur L* et a* des résidus remis en eau [...] .....	203

Figure 146 : Quantités de polyphénols totaux dans les résidus remis en eau [...]... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 147 : Capacité antioxydante globale dans les résidus remis en eau et suivi sur 17 jours  
..... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 148 : Droite étalon de dosage des polyphénols totaux selon Folin-Ciocalteu.. ..... 232

Figure 149 : Droite étalon de mesure de la capacité antioxydante selon TEAC ..... 232

Figure 150 : Droite étalon de chaque polyphénol quantifié par CLHP ..... 233

Figure 151 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols ..... 235

Figure 152 : Cinétiques normalisées d'extraction CO<sub>2</sub>+25 % EtOH des polyphénols. .... 237

Figure 153 : Cinétiques normalisées d'extraction CO<sub>2</sub>+25 % EtOH des polyphénols ..... 239

Figure 154 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols obtenus par EFS [...] ..... 241

Figure 155 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols [...] ..... 243

Figure 156 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols [...] à T = 28 °C ..... 245

Figure 157 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols [...]. ..... 247

---

*Liste des abréviations*


---

$\dot{\gamma}$	Gradient de cisaillement
$\eta$	Viscosité de la phase continue
$\theta$	Angle de contact
$\lambda$	Volume d'une particule
$\tau$	Contrainte visqueuse
$\Sigma$	Somme
$\phi$	Fraction volumique
$E_a$	Energie d'ancrage
$r^2$	Coefficient de corrélation
$[M-H]^+ m/z$	Rapport masse <sub>ion</sub> /charge <sub>ion</sub>
$\gamma_{EH}$	Tension interfaciale entre l'huile et l'eau
AAEAC	Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
EAA	Equivalent Acide Ascorbique
EFS	Extraction par Fluide Supercritique
ESI/APCI	Electrospray Ionisation/Atmospheric Pressure Chemical Ionization
FSC	Fluide Supercritique
GAE	Gallic Acid Equivalent
GRAS	Generally Recognized As Safe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
MS	Mass Spectrometrie
MW	Molecular Weight
ORAC	Oxygen Radical Antioxidant Capacity
PBS	Phosphate Buffered Saline
POD	Peroxydase
PPO	Polyphénoloxydase
TdT	Désoxynucléotidyl-transferase terminale
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TIC-MS	Total Ion Current-Mass Spectrometry
TUNEL	Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling



## Introduction générale

---

Avec une production d'un million de tonnes, l'Aquitaine est l'une des principales régions françaises productrices de fruits et de légumes et occupe le 3<sup>ème</sup> rang des régions productrices françaises derrière la région Provence-Alpes-Côte-D'azur et la région Rhône-Alpes (*Source : Agriculture agroalimentaire en Aquitaine*). Dominée par les pommes, les prunes d'Ente et les kiwis qui totalisent 90 % des volumes fruitiers arboricoles de la région en 2009, la filière fruitière est présente quasiment dans chaque département d'Aquitaine. Au niveau régional, le verger de pommes demeure la production fruitière la plus importante (*Source : Agriculture agroalimentaire en Aquitaine, 2013*) et compte environs 33 entreprises de transformation de fruits et légumes de plus de 20 salariés dont 70 % se trouvent en Lot-et-Garonne. Ainsi en 2013, le département représentait plus de 42 % des exportations totales de l'Aquitaine du secteur des produits à base de fruits et de légumes. Parmi les fruits, c'est la pomme de table (2 millions de tonnes) qui domine de loin la production française et le Lot-et-Garonne en produit 5,3 %. Ainsi, 210 producteurs cultivent 1 923 ha de vergers de pommiers dont la moitié des vergers fait moins de 10 ha et 40 % ont plus de 15 ans. C'est une production fruitière bien ancrée dans le territoire lot et garonnais dont les variétés les plus cultivées sont les pommes *Golden, Gala, Fuji, Braeburn* et *Granny Smith*.

Les fruits et particulièrement les pommes, sont considérés comme des aliments bénéfiques pour la santé, de part leur richesse en fibres et leur faible teneur en lipides. Un bénéfice additionnel de la pomme est sa teneur en polyphénols et en vitamines qui lui confèrent son étiquette riche en "antioxydants" et "aliment santé". Environ 70 % des pommes sont consommées en fruit de table et 30 % sont transformées en produits dérivés principalement de type jus et compote (<http://www.lapomme.org>). Les procédés de transformation génèrent des coproduits sous la forme de broyats d'épidermes et de chair, de gâteaux de presse, pépins, drèches, marcs, fanes et cœurs de végétaux. Aujourd'hui, ces coproduits sont considérés comme sans valeur par les industriels de la transformation et sont utilisés en épandage, compostage, alimentation animale ou bien en valorisation énergétique (méthanisation). Or, au regard des volumes générés, ce sont des sources abondantes de nutriments, de protéines, de fibres... Leur réutilisation est donc de plus en plus évaluée dans une logique de meilleure utilisation des ressources.

Cette thèse est le fruit de la collaboration entre le laboratoire de recherche de Chimie et Biologie des membranes et Nanoobjets (CBMN), situé à Pessac (33600) et le Centre de Ressources Technologiques (CRT) AGROTEC, situé à Agen (47000). AGROTEC, CRT depuis



1989, est impliqué depuis de nombreuses années dans la formulation de nouveaux produits alimentaires et assure un accompagnement scientifique et technique auprès des TPE et PME régionales. La structure propose diverses prestations dans le domaine agroalimentaire telles que la R&D, la mise au point de produits et de procédés, l'organisation industrielle, la mise en place de système de management de la qualité, des formations, de la recherche appliquée et de l'analyse sensorielle. L'origine du projet provient d'une demande récurrente des industriels et des professionnels de valoriser leurs coproduits végétaux, essentiellement des retours de marchandises, des invendus ou des écarts de tri. AGROTEC répond à ces demandes en transformant des végétaux entiers en aliments transformés tels que des soupes, des fruits 4<sup>ème</sup> gamme ou encore des purées de fruits. Cependant, aucune démarche n'a encore été réalisée sur des écarts de tri comme les épidermes, les pépins ou les restes de chairs des végétaux. La thèse s'est déroulée en majorité au sein du CRT afin de rester au plus près des préoccupations industrielles, tout en ayant pour objectif d'apporter des connaissances et des réponses pertinentes à la valorisation de produits.

Les coproduits de pommes étant initialement riches en polyphénols/antioxydants, il est pertinent d'essayer de tirer profit de ces propriétés pour un usage alimentaire. Dans le cadre de la thèse, nous avons sélectionné un coproduit modèle, l'épiderme de pomme, qui concentre de nombreux polyphénols. Les difficultés pour valoriser un coproduit sont la saisonnalité des approvisionnements, la diversité du coproduit (pommes entières résultant d'écart de production, gâteaux de presse) et la variabilité de la composition nutritionnelle. La stabilité des fruits (comme le séchage) est une étape indispensable pour dissocier les phases de production des coproduits, soumises à une forte sensibilité, de celles de leur valorisation. Confrontés à la saisonnalité (récolte en été et automne) et à l'approvisionnement des pommes, la lyophilisation des épidermes a été optée comme méthode de conservation des coproduits. Le travail a donc été principalement réalisé sur des poudres de pommes ou d'épidermes de pommes.

Une voie possible de valorisation des poudres d'épidermes ou des poudres de pommes séchées est la réintroduction dans des produits alimentaires en tant qu'ingrédient, de façon à proposer des aliments enrichis en molécules fonctionnelles. Dans la littérature, muffins, snacks, yaourts ont été préparés avec des épidermes de pommes ou d'extraits de cassis afin d'enrichir en fibres ou apporter une fonctionnalité antioxydante. La réincorporation d'extrait de pomme dans des matrices solides pour ajouter des arômes ou un goût sucré n'a pas été traitée dans cette thèse car c'est une application déjà bien explorée. Nous avons privilégié une autre voie originale de valorisation qui consiste à utiliser les poudres pour stabiliser une émulsion. La seconde voie proposée, si elle est classique dans son principe, n'a pourtant été que peu appliquée aux produits de pommes : il s'agit d'extraire les polyphénols au moyen de la technologie d'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique.

Les émulsions sont des systèmes hétérogènes dans lesquels deux liquides non-miscibles sont dispersés sous forme de gouttelettes. Ces systèmes sont thermodynamiquement instables et nécessitent l'addition d'un stabilisant appelé émulsifiant. Les plus utilisés dans la formulation sont des tensioactifs monomériques, des macromolécules ou des particules solides. Dans le cas des émulsions stabilisées par des particules, dites émulsions de Pickering, les solides utilisés sont essentiellement des particules de silice, d'argiles, de carbone et d'hydroxydes métalliques. Dans un contexte agroalimentaire comme cosmétique, où la demande du consommateur pour des produits plus sains et plus naturels est croissante, la substitution de solides inorganiques par des solides issus du végétal permettrait de répondre à ces attentes tout en faisant bénéficier l'émulsion des molécules fonctionnelles du végétal qui entrent dans sa composition. La seconde voie explore l'utilisation d'un solvant particulier, un mélange de CO<sub>2</sub> et d'éthanol, pour extraire les polyphénols des épidermes de pommes. L'objectif est d'obtenir un pool d'antioxydants par une technique propre, aujourd'hui mature y compris au stade industriel, qui permet également de répondre au contexte d'une chimie plus verte. Si la littérature commence à être riche d'exemples d'extraction par CO<sub>2</sub> à partir de divers coproduits de fruits ou de légumes, une seule étude rapporte l'extraction de polyphénols de la pomme, sans pour autant les identifier ni les quantifier individuellement. La spécificité de la matrice pomme réside dans sa richesse en polyphénols de type quercétines glycosilées, pour lesquelles aucune donnée de solubilité ni d'extraction n'est disponible.

Outre cette introduction et la conclusion générale, le manuscrit est organisé en 3 chapitres principaux, la partie intitulée *Résultats et Discussion* étant subdivisée en 3 sous-chapitres.

A/ L'étude bibliographique a pour objectif de dresser un bilan de connaissances sur les polyphénols de la pomme, leur effet santé et les valorisations existantes des coproduits végétaux. Ce chapitre décrit également les difficultés rencontrées dans la transformation des végétaux et l'impact sur les composés d'intérêt, la technique d'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique et les avantages à utiliser en agroalimentaire les propriétés fonctionnelles des fruits et des légumes.

B/ Le chapitre "Matériel & Méthodes" décrit les techniques utilisées pour la préparation et le traitement des poudres, ainsi que les méthodes de caractérisation des échantillons, essentiellement "l'identification et la quantification" des polyphénols, de la capacité antioxydante et de l'activité biologique des extraits.

C/ Le troisième chapitre décrit les résultats obtenus sur les trois aspects principaux de la thèse. Un premier sous-chapitre concerne la préservation de la capacité antioxydante des épidermes de pommes *Golden Delicious*. L'objectif est de s'assurer que la transformation des épidermes frais en une poudre lyophilisée n'engendre pas de perte en antioxydants. En

revanche, les poudres obtenues, lorsqu'elles sont remises en eau afin de simuler la réincorporation dans une matrice riche en eau, brunissent. Ce chapitre examine également des solutions pour remédier au problème de brunissement enzymatique, comme le traitement thermique, assez classique et l'addition de poudres de fruits naturellement riches en agents antibrunissement. Les techniques existent déjà mais le focus est fait sur l'évolution des propriétés antioxydantes en fonction des traitements thermiques.

Le sous chapitre suivant est dédié à l'utilisation de poudres en tant qu'agent tensioactif stabilisant les émulsions. L'objectif est de remplacer les agents chimiques et de privilégier les composés naturels, en démontrant de nouvelles propriétés fonctionnelles de la pomme. Si les émulsions produites sont généralement stables, leur taille de 20 microns peut sembler trop grande pour une utilisation en l'état en agroalimentaire. Une comparaison a donc été réalisée avec une matrice végétale lipophile, la poudre de cacao.

La troisième partie des résultats est consacrée à l'obtention d'un pool d'antioxydants moyennant une technique d'extraction par fluides supercritiques (EFS) à partir d'épidermes de pommes lyophilisés. La nature des polyphénols, nous a conduit à utiliser des mélanges extractants à base de CO<sub>2</sub>, d'éthanol et d'eau. Diverses conditions ont été testées afin d'optimiser la solubilité et les transferts de ces polyphénols et d'améliorer ainsi l'efficacité de l'extraction. Les extraits obtenus ont été caractérisés en termes de nature des polyphénols, d'activité antioxydante et d'activité antiproliférative sur des cellules cancéreuses. L'effet de différents paramètres a été mis en évidence mais la variabilité intrinsèque de la source de matière première (les 3 lots de pommes *Golden* présentaient des teneurs très différentes en polyphénols) a limité notre capacité d'interprétation. Dans un premier temps, une quantification basée sur le dosage des polyphénols totaux s'est avérée d'une portée limitée et ne permettait pas de dégager des tendances. Un appareil de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) a été acquis à mi-thèse et les analyses plus fines ont été mises au point pour détecter et quantifier neuf polyphénols.

La conclusion générale de cette thèse met en évidence les limites de notre étude et les perspectives associées.



## *Chapitre A. Etude bibliographique*

---

La consommation régulière de fruits et de légumes, prônée dans les médias ou par le Plan National Nutrition Santé, est associée à la richesse en nutriments de ces végétaux. Ce chapitre dresse tout d'abord un bilan des connaissances sur la pomme et plus particulièrement sur les polyphénols, tant sur leur effet santé que sur leur dégradation possible durant les opérations de transformation ou de conservation des fruits, associées en partie à une activité enzymatique d'oxydation. Nous ferons ensuite un point sur l'extraction des polyphénols en présentant plus particulièrement la technique d'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique qui sera largement utilisée dans ce travail. Enfin, une présentation des émulsions et plus particulièrement de leur stabilisation par des particules solides (émulsions de Pickering) terminera ce chapitre.

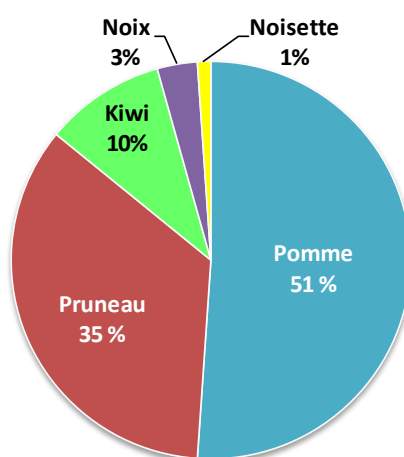
## I. La pomme, source de composés d'intérêt

### I.1. Pommes & coproduits

Depuis une dizaine d'années, les messages des médias associent bien être et consommation de 5 fruits et légumes par jour, car ils sont sources de nutriments comme des antioxydants, des phytostérols ou des fibres (O'Shea 2012, Morales-Soto 2014, Martins 2013, Anderson 2009).

#### I.1.1. Production de fruits et de légumes en Aquitaine

L'Aquitaine est l'une des principales régions françaises productrices de fruits et de légumes avec une production d'environ un million de tonnes qui lui confère le 3<sup>ème</sup> rang des régions productrices françaises (*Source : agriculture agroalimentaire en Aquitaine*). Au niveau régional, le verger de pommes demeure la production fruitière arboricole la plus importante avec les prunes d'Ente et les kiwis qui totalisent à eux trois 90 % des volumes fruitiers (*Source : chambre d'agriculture d'Aquitaine*) (Figure 1). Au niveau de l'espace agricole, 5 % de la surface cultivée est consacrée aux cultures fruitières et légumières avec une prédominance du Lot et Garonne, premier département producteur (*Source : agriculture agroalimentaire en Aquitaine*) (Tableau 1). Ainsi en 2013, le département représentait plus de 42 % des exportations totales de l'Aquitaine du secteur des produits fruits et légumes (*Source : Cluster fruits et légumes 47*). La pomme domine nettement la production fruitière en tonnage avec 90 200 tonnes par an, dont 5,3 % de la production localisée en Lot et Garonne. Les principales variétés de pommes cultivées sont les *Golden, Gala, Fuji, Braeburn* et *Granny Smith*.



*Figure 1 : Répartition de la production fruitière arboricole aquitaine en 2009 (Source ANEA – IVAMER).*

**Tableau 1 : Répartition en pourcentage des productions fruitières et légumières par départements aquitains, en 2009 (Source : ANEA – IVAMER).**

	Départements aquitains				
	24	33	40	47	64
Asperges	6	22	60	12	0
Poireaux	5	50	9	27	9
Laitues	4	23	2	61	11
Fraises	39	2	0	58	1
Aubergines	0	9	1	89	1
Concombres	2	20	3	68	7
Courgettes	11	0	1	85	3
Melons	4	8	0	88	0
Poivrons	0	3	2	92	3
Tomates	6	5	1	87	2
Carottes	0	50	48	2	0
Haricots verts	0	25	44	8	23
Maïs doux	1	12	58	13	17
Pruneaux	8	8	0	85	0
Poires	14	10	0	72	4
Pommes	45	6	1	46	2
Châtaignes	92	2	0	4	2
Noix	89	3	0	8	0
Noisettes	2	5	0	89	3
Kiwis	3	5	35	36	20

Production  
arboricole

### I.1.2. Coproduits végétaux & valorisation

Coproduits, sous-produits et déchets sont des termes communément utilisés pour désigner des productions "induites", c'est-à-dire des productions indissociables des cycles de production du ou des produits commerciaux majeurs. Dans certaines filières, ils peuvent être considérés comme un produit à part entière, disposant d'un marché adossé à une cotation.

La transformation de matière brute en produit alimentaire génère des coproduits, contenant la masse alimentaire comestible perdue, écartée ou dégradée dans les différentes étapes de la chaîne de production/transformation. Les restes sont les épidermes, les tiges, les noyaux, les graines, les cosse, le son ou la paille des céréales, les peaux de poissons, le cerveau et les os, les eaux usées... Les coproduits alimentaires ont longtemps été considérés comme des matières indésirables qui sont éliminées, avec un coût, via l'alimentation animale, les décharges ou l'incinération. De nos jours, ils sont de plus en plus considérés comme une source prometteuse de nutraceutiques et de produits à haute valeur ajoutée (O'Shea 2012, Galanakis 2012).

En 1994, l'ADEME avait estimé le volume total de coproduits liés à la transformation des végétaux en France, à 424 960 tonnes dont 10 % provenant de la transformation des fruits (Source : *Les études de France Agrimer 2012*). Les coproduits varient selon les fruits concernés et la transformation envisagée (confitures, compotes, fruits au sirop, jus...). Il s'agit principalement d'écarts de triages, de restes de parages et de résidus de fabrication de purée, compotes et jus. Ils

peuvent être constitués de noyaux, pépins, akènes, queues, peaux et cœurs (poire et pomme), ... Par ailleurs, les coproduits de la filière fruits et légumes présentent une certaine saisonnalité, ils sont plus abondants en été et automne (de juillet à novembre) et plus faibles au printemps (d'avril à juin).

D'une manière générale, la valorisation est définie comme étant « toute opération produisant principalement des déchets servant à des fins utiles en remplaçant d'autres matières qui auraient été utilisées à une fin particulière, ou des déchets préparés à être utilisés à cette fin, dans l'usine ou dans l'ensemble de l'économie » (*Source : article 3 de la Directive cadre déchet 2008/98/CE du 19 novembre 2008/définition de la directive cadre déchet révisée*). En agro-industrie, la valorisation est la transformation de déchets et/ou coproduits industriels en vue de les réintroduire sur un marché à titre de nouveaux ingrédients ou comme nouveaux produits. La valorisation de ces coproduits permet de réduire ou d'éliminer leurs coûts de gestion et d'élimination, tout en générant de nouvelles ressources. Par souci de simplification, les différents usages existants ont été regroupés en 4 grands types de valorisation :

- La consommation humaine: il peut s'agir de produits destinés à l'alimentation humaine ou bien de matériaux au sens large : production de molécules issues de la chimie biosourcée ou de matériaux "traditionnels". Les secteurs sont ceux de l'agroalimentaire, la chimie, la pharmaceutique voire la cosmétique.

- L'alimentation animale : cette catégorie regroupe la fabrication d'aliments pour animaux d'élevage et de compagnie. La valorisation se fait directement en élevage ou les coproduits sont envoyés vers les industries de l'alimentation animale.

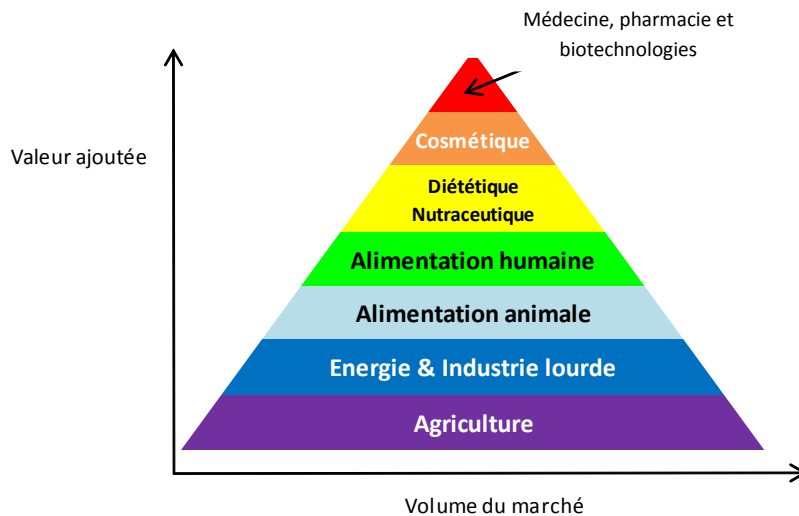
- La valorisation agronomique : elle regroupe aussi bien la production d'engrais et de composte que l'épandage direct avec enfouissement superficiel pour lequel il est plus difficile de parler de valorisation car c'est le pouvoir épurateur du sol qui est sollicité (Albrecht 2007). Les industries de la fertilisation font parties de ce secteur.

- La production d'énergie par combustion ou méthanisation et les industries de biocarburants en font également parties.

Actuellement, la majorité des coproduits est destinée à l'alimentation animale, l'épandage et la méthanisation, qui sont des secteurs de valorisation de grand volume mais à faible valeur ajoutée, comme le présente la Figure 2. La nutraceutique, la cosmétique et la pharmacie sont des secteurs minoritaires en termes de volume de marché, mais ils offrent une valeur ajoutée relativement importante, qui nécessitent cependant un fort investissement en recherche et développement. Dans ce travail, nous nous intéresserons à la valorisation de coproduits de pommes, principalement dans le secteur de l'alimentation humaine voire de la cosmétique, qui



sont les débouchés privilégiés des végétaux (et de leurs coproduits) riches en molécules d'intérêt pour l'Homme (Laufenberg 2003).



*Figure 2 : Volume du marché et valeur ajoutée des coproduits (Source : Ifremer 2010).*

### I.1.3. Cas particulier de la pomme

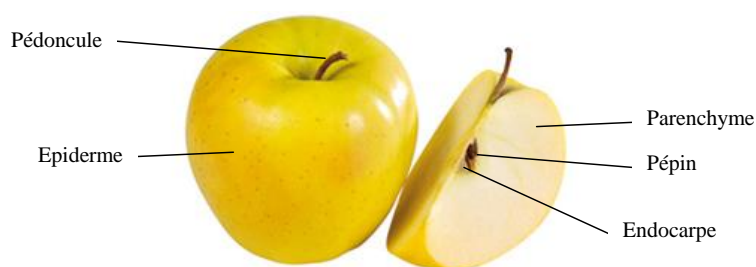
Les pommes sont les fruits les plus consommés dans le monde et sont la source principale de nutriments et d'antioxydants dans l'alimentation humaine. La pomme est le fruit "santé" de référence. Les français consomment en moyenne 20 kg de pommes par habitant et par an. Cela correspond à 20,4 % de part de marché des fruits, devant la banane (14 %) et l'orange (12 %) (<http://www.lapomme.org>) (<http://www.wapa-association.org>). Parmi les fruits, c'est la pomme de table (1,5 millions de tonnes en 2013) qui domine largement la production française (Source : *Les études de France Agrimer 2012*).

Les pommes ont une composition variée et équilibrée avec une diversité en vitamines et un contenu en fibres supérieur aux autres fruits (Tableau 2). De plus, elles sont modérément énergétiques d'un point de vue calorique (Feliciano 2010, <http://www.aprifel.com>). La prévention des maladies chroniques est associée à une consommation de pommes (Rupasinghe 2012) en particulier dans les maladies cardiovasculaires en relation avec les principaux composés actifs de la pomme, les fibres et les polyphénols (Serra 2012).

Tableau 2: Composition nutritionnelle de la pomme (Source ANSES).

Constituant	g/100g	Minéraux	g/100g		µg/100g
Eau	85,3	Sodium	2,01	β - carotène	37,5
Protéines	0,31	Magnésium	6,08	Vitamine K1	2,8
Glucides	11,3	Phosphore	10	Vitamine B9	3,86
Lipides	0,16	Potassium	120		
Sucres	11,3	Calcium	5,12		mg/100g
Fibres	1,95	Manganèse	0,04	Vitamine E	0,59
		Fer	0,12	Vitamine C	6,45
		Cuivre	0,04	Vitamine B1	0,035
		Zinc	< 0,15	Vitamine B2	0,025
				Vitamine B5	0,1
				Vitamine B6	0,07

La pomme est le fruit du pommier commun, *Malus domestica*. Au niveau tissulaire, elle est composée de 3 structures (Figure 3): l'épiderme qui est la couche la plus externe, puis le mésocarpe, également nommé parenchyme, qui est la partie charnue généralement consommée et l'endocarpe qui est la zone la plus interne, qui contient les pépins.

Figure 3: Structure d'une pomme.

La pomme est consommée sous forme de fruit entier mais également sous forme de jus et de compote pour environ 30 % de la production. Cela génère d'importants volumes de coproduits incluant les pelures, les drèches, les gâteaux de presse... La fabrication d'un jus consiste en une suite d'opérations illustrées Figure 4. Les fruits sont d'abord triés, lavés, broyés puis pressés. Le pressurage va libérer le jus. Le jus est contenu dans la vacuole des cellules parenchymateuses de la chair. Pour extraire le jus, il faut désorganiser les tissus pour obtenir une pulpe composée de cellules, de fragments de paroi constituée par un gel rigide de pectines, de cellulose et d'hémicelluloses, baignant dans le liquide issu des vacuoles. Le jus brut obtenu est ensuite clarifié par filtration ou centrifugation. Pour augmenter ce rendement, il existe des prétraitements tels que l'ajout d'adjuvants de filtration ou encore la dépectinisation par ajout d'enzymes pectolytiques. Le jus est ensuite pasteurisé.



*Figure 4 : Etapes de fabrication de jus de pommes. A/ Lavage, B/ Broyage, C/ Pressage, D/ Gâteau de presse, E/ Embouteillage (Source Agrotec).*

Ces étapes de transformation génèrent des "gâteaux de presse" qui sont constitués des chairs pressées, de l'épiderme, des pédoncules et des pépins (Figure 4-D). A l'heure actuelle, ces gâteaux de presse sont essentiellement utilisés en épandage et en compostage. Une valorisation différente peut être envisagée, selon l'exemple du marc de pommes à cidre. Ainsi, le volume brut des coproduits de la filière cidricole (marcs, bourbes, ...) est estimé à 75 000 tonnes par an. Le marc de pomme est présent sur le marché sous 3 états : deux formes ayant une forte teneur en eau (60 % et 80 % d'eau), vendues voir cédées à titre gratuit aux éleveurs dans un proche périmètre pour le compostage et l'épandage et une forme déshydratée (95 % de matière sèche) utilisée par l'industrie de la nutrition animale et/ou la fabrication de pectines par exemple (Société Cargill). Ainsi, si la voie de valorisation majeure du marc de pomme est l'alimentation animale, ils peuvent être sources de constituants d'intérêt (pectine, polyphénols...) qui peuvent être utilisés par d'autres industries (chimie verte, industrie agroalimentaires, texturants) (Source : AGRESTE Aquitaine 2011).

Selon l'ADEME en 2013, les coûts constatés de valorisation des végétaux en compostage, réalisé sur une plateforme externe, sont en moyenne de 0,1 €/kg pour l'agriculteur ou le producteur. De la même façon, les industries agroalimentaires doivent s'affranchir de taxes pour éliminer leurs coproduits et déchets. Les coproduits peuvent cependant être valorisés à plus forte valeur ajoutée, en les transformant pour être revendus en agroalimentaire ou en cosmétique. Par exemple, plusieurs produits à base de pomme sont en vente sur le marché actuellement. Par

exemple, la phloridzine, un antioxydant, extraite de pépins de pommes se vend 1 000 €/kg en pharmaceutique ou en cosmétique (Source : Val de Rance). La pectine de pomme se trouve en gellule pour ces propriétés « coupe faim » et sous forme de fibres de pommes pour améliorer le transit (Source : MyProtein). Les coûts se situent entre 48 €/kg pour les pommes les moins transformées et 460 €/kg. Une poudre de pomme biologique (50% de pomme minimum garantis), de qualité cosmétique et alimentaire, fixée sur support maltodextrines et gomme arabique est au prix de 350 €/kg (Source : AromaZone). Enfin, un extrait hydroalcoolique de pommes séchées se vend 100 €/kg en cosmétique pour des propriétés anti-âge et énergisantes.

Les coûts de transformation des coproduits de pomme frais en produits finis de type poudre ont été évalués par AGROTEC. Un kilogramme de marcs de pommes contient 10 % de matière sèche et 90 % d'eau. Cela signifie, que le séchage de 1 kg de matière fraîche en 0,1 kg de matière sèche coûte 0,1 €/0,1 kg de matière sèche pour un séchage à air forcé et 1 €/0,1 kg pour une lyophilisation. Si le broyage et le conditionnement sont ajoutés, le coût moyen total de transformation d'une pomme en poudre de pomme est de 16,6 à 32,6 €/kg.

Les coproduits issus de produits agricoles peuvent être utilisés pour leur valorisation dans le secteur alimentaire, à condition néanmoins de satisfaire à la réglementation sur l'incorporation de produits dans les aliments et l'utilisation des coproduits. Leur incorporation a pour objectif de conférer des caractéristiques particulières à l'aliment, par exemple une activité antioxydante pour les polyphénols, une amélioration du transit intestinal pour les fibres ou une supplémentation en minéraux. Sur ce principe, quelques aliments fonctionnels ont été mis au point avec différentes matrices végétales, dont des pelures de pommes *Granny Smith* séchées (Henriquez 2010, Rupasinghe 2008). Des muffins ont ainsi été enrichis avec des épidermes de pommes, ces derniers apportant des composés phénoliques et des fibres comme valeur ajoutée (Rupasinghe 2008). L'incorporation de 10 % d'épidermes de pommes dans des snacks extrudés suffit à augmenter la capacité antioxydante des produits finis ainsi que leurs concentrations en polyphénols tels que l'acide chlorogénique et la quercétine (Reis 2014). L'incorporation se fait dans des produits secs mais également dans les produits liquides comme des yaourts. Ainsi, des extraits de cassis ayant une forte concentration en polyphénols et en anthocyanes ont été ajoutés dans des yaourts à boire pour apporter une saveur et une fonctionnalité antioxydante (Zhou 2013). Des jus de pommes ont été améliorés en termes d'activité antioxydante et de polyphénols en y ajoutant des antioxydants extraits à partir de marcs de pommes (Savatovic 2009). Le taux de flavonoïdes et d'acide chlorogénique dans les jus enrichis augmente respectivement de 1,4 à 9 fois, par rapport aux jus de pommes conventionnels (Van Der Sluis 2004). Les feuilles des végétaux sont également considérées comme des coproduits. Kolniak-Ostek *et al.* (2013) ont réincorporé des feuilles de pommier dans des boissons: l'addition de 5 % de feuilles augmente ainsi les polyphénols totaux et les procyanidines jusqu'à 5 à 6 fois et le pouvoir antioxydant jusqu'à 2,7 fois.

Il est donc montré que les coproduits peuvent donc être utilisés dans la formulation de produits alimentaires, leur réincorporation engendre souvent le changement de leurs propriétés physicochimiques comme la couleur (Davidov-Pardo 2012, Van Der Sluis 2004), la texture ou les propriétés rhéologiques. Par exemple, l'incorporation de microcapsules d'extraits de pépins de raisins dans une préparation de cookies a augmenté leur activité antioxydante mais les cookies enrichis n'ont plus la même couleur que les cookies initiaux (Davidov-Pardo 2012). Les marcs de pommes broyés incorporés dans de la farine de blé augmentent l'absorption d'eau et modifie donc l'élasticité des produits finis (Sudha 2007).

## I.2. Polyphénols et antioxydants

Dans le règne des végétaux, les polyphénols font partie des métabolites secondaires qui participent à la défense de la plante contre les agressions de l'environnement (température, lumière) ou de pathogènes. Ils constituent une classe d'environ 8 000 composés qui est subdivisée en plusieurs catégories selon leur structure. Les polyphénols ont pour fonction *in vitro* d'inactiver les radicaux libres tels que les peroxydes lipidiques, et par chélation, les ions métaux divalents en réduisant leur potentiel oxydatif. Les polyphénols participent également à la couleur des feuilles, des fleurs et des fruits et ont également des fonctions antimicrobiennes et antifongiques.

Comme pour la plupart des métabolites secondaires, il existe une extrême diversité de répartition de ces composés selon les espèces, et en fonction des différents organes et tissus d'une même plante. La teneur en composés phénoliques de quelques végétaux consommés par l'Homme est illustrée dans le Tableau 3.

**Tableau 3** : Récapitulatif des classes de polyphénols présents dans les fruits et les légumes, les racines et les feuilles (Macheix 2006).

MS : Matière sèche

	Composés phénoliques	Teneurs
<b>Légumes</b>		
Légumes secs	Phénols totaux	300mg à 17 g/kg
Pomme de terre	Acides phénoliques	32 à 103 mg/kg
Oignon	Dérivés de la quercétine	56 à 1020 mg/kg
<b>Fruits</b>		
Pomme	Phénols totaux	100 mg à 3 g/kg
	Acide chlorogénique	26 à 510 mg/kg
Raisin rouge	Phénols totaux	500 mg à 5,6 g/kg
Raisin rouge (pellicule)	Anthocyanes	200 mg à 5 g/kg
Cassis	Anthocyanes	1 à 10 g/kg
Myrtille	Anthocyanes	3 à 3,5 g/kg
<b>Divers</b>		
Feuille de thé vert	Phénols totaux	39% MS
Grains de café	Esters caféiques	6 à 10% MS
Grains de sorgho	Tanins	4% MS
Bois (hêtre, chêne...)	Lignines	15 à 35% du bois

### I.2.1. Classes de polyphénols

Les polyphénols sont caractérisés par leur structure avec la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques de carbones où sont directement liés deux ou plusieurs groupes "hydroxyl". Ces structures se présentent soit sous la forme de molécule phénolique simple, soit sous la forme d'un complexe de haut poids moléculaire de polymères. L'activité antioxydante des polyphénols dépend de leur structure, en particulier du nombre et de la position des groupements "hydroxyl" et de la nature des substitutions des cycles aromatiques. Ils sont en général en plus grandes concentrations dans les épidermes des fruits ou dans les feuilles des légumes.

Les polyphénols de la pomme sont bien identifiés et une littérature abondante en décrit la répartition dans le fruit et les variations en fonction de la variété (voir paragraphe I.2.2) (Ignat 2011). Lu *et al.* ont caractérisé et quantifié les polyphénols majeurs de la pomme dès 1997, tandis que Tsao *et al.* ont résumé leur extraction, leur synthèse et biosynthèse au sein de la plante ainsi que les activités biologiques responsables des effets santé de la pomme (Lu 1997, Tsao 2010). Les pommes contiennent 60 polyphénols différents (Rupasinghe 2012) qui représentent une moyenne de 179,1 mg GAE/100 g de végétal (Brat 2006) et sont répartis en deux classes principales : les flavonoïdes et les acides phénoliques (Tableau 4).

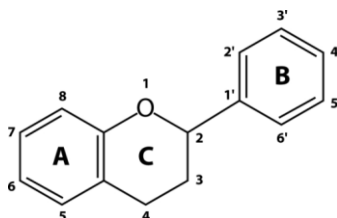
*Tableau 4 : Composition en polyphénols de la pomme fraîche selon la banque de données phénol-explorer.*

*MF : Matière fraîche*

Classe	Sous classe	Polyphénol	Teneur mg/100g MF
Flavonoïdes	Anthocyanes	Cyanidine-3-O-galactoside	0,81
		Cyanidine-3-O-arabinoside	0,06
		Cyanidine-3-O-xyloside	0,06
	Dihydrochalcones	Phloridzine	2,75
		Phlorétine-2'-O-xylosyl-glucoside	2,6
		3-Hydroxyphlorétine-2'-O-glucoside	0,11
	Flavanols	(+)-Catéchine	1,24
		(-)-Epicatéchine	8,33
		Procyanidine B2	14,56
	Flavonols	Quercétine	0,13
		Quercétine-3-O-galactoside	2,36
		Quercétine-3-O-glucoside	0,64
		Quercétine-3-O-xyloside	0,78
		Quercétine-3-O-rhamnoside	1,33
		Quercétine-3-O-rutinoside	0,23
		Quercétine-3-O-arabinoside	1,4
Acides phénoliques	Acides hydroxybenzoïques	Acide gentisique	0,22
		Acide syringique	0,9
	Acides hydroxycinnamiques	Acide p-coumarique	0,29
		Acide-5-p-coumaroylquinique	1,05
		Acide-4-p-coumaroylquinique	2,25
		Acide caféique	0,42
		Acide férulique	0,06
		Acide-4-caféoylquinique	0,54
		Acide-4-caféoylquinique	13,25

Les quatre groupes de polyphénols majeurs sont les acides hydroxycinnamiques (l'acide chlorogénique est le plus représenté), les dérivés dihydrochalcones (notamment la phloridzine), les flavan-3-ols (catéchine en monomère ou les procyanidines comme oligomères) et les flavonols (quercétine et dérivés de quercétines) (Kahle 2005, Colin-Henrion 2008).

#### a/ Les flavonoïdes



*Figure 5 : Structure générale des flavonoïdes (Colin-Henrion 2008).*

Les flavonoïdes représentent la classe majoritaire des pommes (Tableau 4). Leur structure générale est en C6-C3-C6 (noyau flavane) où les deux unités C6 (cycle A et B) sont de nature phénolique (Figure 5). Il existe plusieurs sous classes de flavonoïdes selon le degré d'oxydation de l'hétérocycle C (les flavanols, les catéchines, les dihydrochalcones, les flavonols et les anthocyanes). La vaste majorité des flavonoïdes ont leur cycle B lié en C2 du cycle C, quelques flavonoïdes tels que les isoflavones et les néoflavonoïdes ont le cycle B connecté respectivement aux positions C3 et C4 du cycle C. Les dihydrochalcones, dépourvus de l'hétérocycle C, appartiennent également à la famille des flavonoïdes. Dans les plantes, les flavonoïdes existent généralement sous forme glycosilée. Les activités biologiques des composés, incluant l'activité antioxydante, dépendent des structures différentes et des groupes glycosilés.

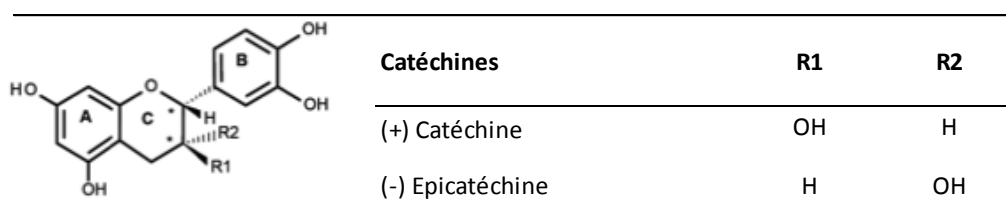
#### *Les flavanols et les proanthocyanidines*

Ces composés sont communément appelés catéchines sous forme monomérique et sont la sous-classe de flavonoïdes la plus importante dans le pommé avec une moyenne de 24,13 mg/100g de matière fraîche. Ils ne possèdent ni de double liaison en C2 et C3, ni de carbonyl C4 sur le cycle C contrairement aux flavonoïdes (Figure 6). Une de leurs caractéristiques est de posséder deux centres chiraux sur la molécule (en C2 et C3), donc quatre possibilités de diastéréoisomères. Les catéchines sont des isomères avec une configuration *trans* et l'épicatéchine est le seul avec une configuration *cis*. Chacune de ces deux configurations ont deux isomères, (+)-catéchine, (-)-catéchine, (+)-épicatéchine et (-)-épicatéchine. Les isomères (+)-catéchine et (-)-épicatéchine sont les isomères les plus abondants dans les plantes. Les flavonols sont trouvés dans les fruits, particulièrement dans les épidermes des raisins, des pommes et des myrtilles. Dans la pomme, l'(-)-épicatéchine représente 95 % des unités de flavan-3-ols (Guyot 2002). Les

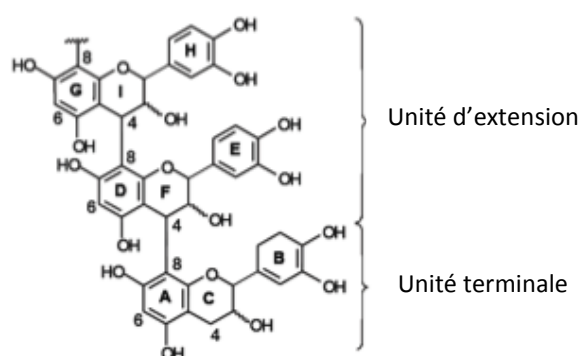


catéchines et épicatechines peuvent former des polymères et sont souvent appelés les proanthocyanidines (Figure 7).

Les proanthocyanidines sont traditionnellement considérées comme des tannins condensés. Lorsque leurs unités constitutives sont uniquement la (-)-épicatechine et la (+)-catéchine, ces formes polymériques prennent le nom de procyanidines. Les flavonols et les oligomères (contenant 2-7 unités monomériques) sont connus pour être de forts antioxydants, ils sont associés à plusieurs effets santé.



*Figure 6 : Les catéchines de la pomme (Colin-Henrion 2008).*

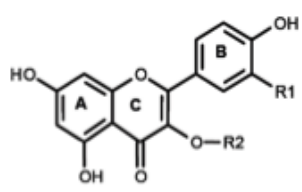


*Figure 7 : Structure générale des proanthocyanidines (Colin-Henrion 2008).*

### ***Les flavones, les flavonols et les flavanones***

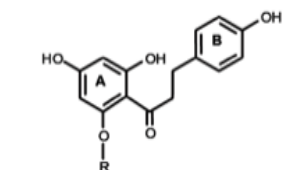
Ces sous groupes de flavonoïdes sont les plus communs dans le règne végétal. Les flavones et leurs dérivés 3-hydroxy-flavonols, ont tous trois cycles. Les flavonols les plus communs sous forme aglycone, sont la quercétine et kaempferol, qui n'ont pas respectivement moins de 279 et 347 combinaisons glycosidiques. Ils sont caractérisés par l'insaturation du cycle C et par la présence d'un groupe "hydroxyl" en C3 (Robards 1999). Les flavonones sont également appelés dihydroflavonols, caractérisés par la présence d'une chaîne saturée en C3 et d'un atome d'oxygène en C4.



	Flavonols	R1	R2
	Quercétine	OH	H
	Hyperoside (Q-galactoside)	OH	Gal
	Quercitine (Q-rhamnoside)	OH	Rha
	Isoquercétine (Q-glucoside)	OH	Glc
	Reynoutrine (Q-xyloside)	OH	Xyl
	Avicularine (Q-Arabinoside)	OH	Ara
	Rutine	OH	Rha-Glc

*Figure 8 : Les flavonols de la pomme (Colin-Henrion 2008).*

### *Les isoflavones et les dihydrochalcones*

	Dihydrochalcones	R
	Phlorétine	H
	Phloridzine	Glc
	Xyloglucoside de phlorétine	Glc-Xyl

*Figure 9 : Les dihydrochalcones de la pomme (Colin-Henrion 2008).*

Les isoflavones ont un cycle B lié en position C3 du cycle C et possèdent des groupes "hydroxyl" en C4 et C7. Les isoflavones sont connus pour avoir des effets bénéfiques sur les maladies humaines. Les dihydrochalcones sont retrouvées dans les fruits, comme la pomme, le houblon et par conséquent les bières. Ce sont des marqueurs spécifiques des fruits (Robards 1999).

La pomme est constituée principalement de phloridzine et de xyloglucoside de phlorétine.

### *Les anthocyanes*

Ce sont principalement des pigments hydrosolubles, de couleur rouge, bleu et violet. Elles composent majoritairement les pétales de fleurs, les fruits, les légumes et certaines graines. Un total de plus de 500 anthocyanes sont connues, elles sont constituées de groupes hydroxyl, méthyl sur le cycle B et glycosyl de différentes unités sucre. Pour les pommes, les anthocyanes ne sont présentes que dans les pommes de couleur rouge (*Fuji, Red Delicious,...*). Les anthocyanidines (forme aglycone) sont la structure de base des anthocyanes (forme glycosilée), trouvée le plus souvent sous la forme glycosilées. Leur structure consiste en un cycle aromatique A lié au cycle C contenant un atome d'oxygène (Ignat 2011).

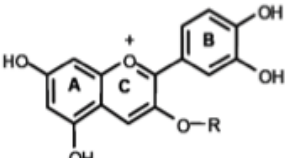
	Anthocyanes	R
	Cyanidine	H
	Idéaine	Gal

Figure 10 : Les anthocyanes de la pomme (Colin-Henrion 2008).

## b/ Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont divisés en deux sous classes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques, basés sur une chaîne C1-C6 et C3-C6 respectivement (Figures 11 et 12). Ils sont présents dans les végétaux sous deux formes, libre et liée. Dans les matrices végétales, ces acides phénoliques peuvent être libérés par hydrolyse acide, alcaline ou par des enzymes. Dans les pommes, le principal acide phénolique est l'acide 5'-caféoylquinique, aussi appelé acide chlorogénique.

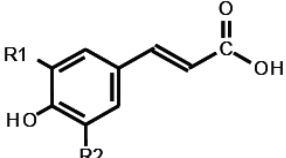
	Acides hydroxycinnamiques	R1	R2
	Acide p-coumarique	H	H
	Acide caféique	OH	H
	Acide férulique	OCH <sub>3</sub>	H
	Acide sinapique	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Figure 11 : Les acides hydroxycinnamiques de la pomme (Colin-Henrion 2008).

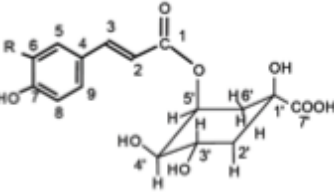
	Esters hydroxycinnamiques	R
	Acide 5'-p-coumaroylquinique	H
	Acide 5'-caféoylquinique	OH

Figure 12 : Les esters hydroxycinnamiques de la pomme (Colin-Henrion 2008).

## c/ Les tannins, les stilbènes et les lignanes

Bien que peu présents dans la pomme, les tannins constituent un troisième groupe de polyphénols important. Ce groupe est généralement subdivisé en tannins hydrolysables et condensés. Les tannins sont des molécules à haut poids moléculaire. Les proanthocyanidines (tannins condensés) sont des flavonoïdes polymériques, la plupart sont composés des flavanols d'épicatéchine et de catéchine. Les tannins hydrolysables sont eux dérivés de l'acide gallique.

Les stilbènes et les lignanes sont moins connus car peu consommés par l'Homme. Leur principal représentant est le resvératrol, trouvé principalement dans le raisin. Ils sont présents dans la nature sous les deux formes : libre et glycosylée. Cette classe de polyphénols a un réel potentiel dans la chimiothérapie (Ignat 2011).

### **I.2.2. Teneurs et variabilité des fruits et des coproduits en polyphénols**

#### **a/ Richesse de l'épiderme et par conséquent des gâteaux de presse**

La richesse des épidermes en polyphénols est globalement une généralité dans les fruits (Balasundram 2006). Bien que représentant seulement 12 à 20 % du poids du fruit entier (en fonction du calibre), l'épiderme contribue très fortement à la quantité de polyphénols totaux (Lata 2009). Dans les pommes de table, 50 % des polyphénols sont concentrés dans les parties épidermiques et sous-épidermiques, avec des teneurs de 3 à 6 fois celle de la chair (Guyot 2002). Ainsi, dans la chair, les polyphénols totaux représentent entre 0,33 et 0,93 mg/g du poids frais (Tsao 2003).

Les variations sont encore plus marquées lorsqu'on s'intéresse précisément aux molécules et non aux classes ou aux polyphénols totaux. Les flavonols et les dihydrochalcones telle que la phloridzine sont particulièrement concentrés dans les épidermes, alors que les acides hydroxycinnamiques dont l'acide chlorogénique, sont les seuls composés à être plus abondants dans la chair que dans l'épiderme (Colin-Henrion 2008, Karaman 2013, Tsao 2003, Leccese 2009, Rupasinghe 2008).

Puisque les épidermes sont riches en polyphénols, ces composés devraient se retrouver dans les coproduits issus de leurs transformations tels que les gâteaux de presse. Des coproduits de grenade obtenus lors de la fabrication de jus présentent effectivement une activité antioxydante significative en lien avec la présence d'acides phénoliques, de flavonoïdes et de tannins (Viuda-Martos 2011, Viuda-Martos 2012). Avec des teneurs de l'ordre de 54 mg d'équivalent acide gallique/g d'échantillon pour les polyphénols totaux, 42 mg d'équivalent rutine/g pour les flavonoïdes et de 21 mg d'équivalent catéchines/g pour les tannins, la poudre lyophilisée d'épiderme de grenade est considérée comme une source intéressante de composés naturels présentant une activité antioxydante significative. De la même façon, des coproduits de pelures de tomates sont identifiés comme une source potentielle d'acides phénoliques et de flavonoïdes (Etkovic 2012).

Diverses études ont montré que les jus de pommes ou les cidres contenaient moins de polyphénols que les gâteaux de presse (Sanoner 1999, Van Der Sluis 2002). Les épidermes de pommes contiennent 3 300 mg/100 g de poids sec de polyphénols, alors que le lyophilisat établit à

partir de marc de pommes en contient 118 mg/g (Balasundram 2006). A l'échelle cellulaire, les polyphénols s'accumulent principalement sur deux sites : d'une part la paroi cellulaire où sont présentes les lignines et certains flavonoïdes ou molécules associées aux lignines comme l'acide férulique et d'autre part, la vacuole où sont stockés les composés phénoliques solubles tels que l'acide chlorogénique, les anthocyanes, les flavonols et les tannins (Macheix 2006). Les interactions entre les polyphénols et les chaînes polysaccharidiques de la paroi cellulaire pourraient limiter leur extraction lors du pressage (Renard 2001). Les jus ou les cidres contiennent ainsi des acides hydroxycinnamiques alors que les flavonols et les anthocyanes sont retenus dans les gâteaux de presse (Verdu 2013). De plus, l'enzymage lorsqu'il est utilisé pour augmenter le rendement du jus, cause une perte de 31 % de phloridzine, 44 % d'acide chlorogénique et 58 % de catéchines. Ces composés sont sensibles à l'oxydation et sont connus pour être des substrats de la polyphénoloxylase. L'acide chlorogénique est un composé hydrosoluble, ce qui explique qu'il soit retrouvé en grande quantité dans le jus. Les catéchines sont des composés vulnérables durant la production de jus de pommes. Leur quantité totale dans le jus brut et le gâteau de presse de pommes est 43 % plus faible que les quantités présentes dans les pommes fraîches ou la pulpe (80 % plus faible dans le cas de la pulpe enzymée) (Van der Sluis 2002). Les principaux polyphénols retrouvés dans les gâteaux de presse sont la procyanidine B2, l'acide chlorogénique, l'épicatéchine et la quercétine, qui sont les mêmes que ceux constituant le fruit entier (Bai 2013, Manach 2004, Soares 2008).

Outre les épidermes, les pépins peuvent être des coproduits valorisables. Walia *et al.* (2014) proposent d'utiliser les pépins de pommes issus de la préparation des compotes pour en extraire une huile. L'huile extraite contient des phytonutriments et des antioxydants ayant des propriétés anticancéreuses *in vitro*. Les quantités de polyphénols totaux dans des pépins délipidés de pommes se situent entre 18,4 mg/g et 99,8 mg/g avec la phloridzine comme composé phénolique principal (Fromm 2012).

## **b/ Incidence de la variété et des conditions de culture**

La teneur totale et la composition en polyphénols varient sensiblement en fonction de la variété de pommes (Ceymann 2012, Jelodarian 2012, Manach 2004, Carbone 2011, Lata 2007b, Guyot 2003, Sacchetti 2008, Serra 2010a), ainsi que l'illustrent les tableaux suivants (Tableaux 5, 6 et 7). La variété *Golden* présente une quantité significative de dérivés de quercétine, mais peu de catéchine, surtout comparée à la *Red Delicious*, par exemple.

**Tableau 5 :** Présentation des polyphénols de plusieurs variétés de pommes (Manach 2004). Ce tableau rassemble les données de plusieurs études, ce qui explique les différentes valeurs présentées pour chaque variété.

CAT : catéchine ; EPI : épicatechine ; PCB1 : procyanidine B1 ; PCB2 : procyanidine B2 ; AC : acide chlorogénique ; CQA : acide caféoylquinique ; P : phloridzine ; QG : quercétine-galactoside et quercétine - glucoside ; QR : quercétine-rhamnoside.

Variété	CAT	EPI	PCB1	PCB2	AC	CQA	P	QG	QR
	mg/100g matière fraîche								
Boskoop	1,3	8,9		1,6	25				
Breabum	0,45	5,4		5,77	4,48	1,67	1,01	4,86	0,78
Estar	1,24 0,4	8,17 4,1		1	3,1				
Empire		2,28		3,44	11,52		2,8	6,6	3,84
Fuji	0,82	6,11		6,5	12,34	0,76	1,31	2,26	0,54
Golden Delicious		7,12		6,28	8,48		1,8	6,6	3,84
	0,47	5,18		6,76	9,18	1,35	1,49	3,55	1,39
	0,53 0,8	7,42 9,2	1,5	6,4	8,3		4,3	2,8	
Idared	0,6	3,9		1,1	12,6				
Jonagold	0,4	6,71							
	0,8	6,2		2,6	12				
	2,1	7,8	0,4	6	3,8		0,6	1,2	
Red Delicious	2,37	10,55		7,91	7,09	2,46	3,23	2,64	0,59
	3,1	14,8	5,6	9,7	9,7		9,6	3,2	

**Tableau 6 :** Composition en polyphénols de variétés de pomme selon Guyot et al. (Guyot 2003).

CAT : catéchine ; EPI : épicatechine ; PCB2 : procyanidine B2 ; PT : procyanidines totales ; CQA : acide caféoylquinique ; pCoQA : acide p-coumaroylquinique ; P : phloridzine ; TPC : polyphénols totaux.

Variété	CAT	EPI	PCB2	PT	CQA	pCoQA	P	TPC
	mg/kg matière fraîche							
Avrolles			19	2750	191	119	31	3182
Beadan	150	497	374	1910	689	150	32	3441
Dous Moen	124	376	235	1557	953	107	19	3161
Kermerrien	47	615	589	3280	993	99	51	5065
Petit Jaune	24	124	181	1300	395	28	16	1899

**Tableau 7 :** Quantité de polyphénols totaux dans différentes variétés de pommes (Sacchetti 2008).

CAT : catéchine ; PCB1 : procyanidine B1 ; MF : matière fraîche.

Variété	CAT	PCB1
	mg/100gMF	mg/100g MF
Campanino	4,99	11,43
Commercio	2,21	11,56
Decio	3,01	9,02
Durello	4,34	12,66
Golde Delicious	2,65	9,89
Puppino	5,29	18,78
Verdone	3,95	14,29

La composition phénolique varie également au cours du développement et de la maturation du fruit. Dans la pomme, la concentration en flavonoïdes décroît fortement au cours du développement du fruit, parallèlement à des modifications du degré de polymérisation des procyanidines (Renard 2007). Plus globalement, l'activité antioxydante et le contenu en polyphénols décroissent rapidement au cours de la maturation du fruit (Zheng 2012). Les pommes non mûres, qui sont souvent écartées lors de la fabrication des produits, peuvent donc représenter une bonne source d'antioxydants. Des facteurs environnementaux influencent également le contenu en polyphénols des fruits, qu'il s'agisse de l'effet de facteurs isolés (température, rayonnement) ou de combinaisons complexes de facteurs (effet des variations climatiques, effet de la région de production). Par exemple, des légumes exposés à la lumière solaire contiennent davantage de flavonoïdes que des légumes cultivés sous ombrage (Watzl 2001) et selon la saison, une augmentation de 3,05 mg/g à 9,54 mg/g des polyphénols totaux de l'épiderme a été mise en évidence dans la pomme (Lata 2007).

### **I.2.3. Propriétés antioxydantes des polyphénols & effet santé**

#### **a/ Activité antioxydante**

Le principe de l'activité antioxydante est basé sur la disponibilité des électrons à neutraliser les radicaux libres. La plupart des fruits ont une capacité antioxydante (Wang 1996) et notamment une capacité à inhiber les radicaux libres (Omata 2010, Ojeil 2010). Les propriétés antioxydantes et pharmacologiques associées à une plante sont généralement liées à la présence de composés phénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes. De part leur structure, les polyphénols ont un fort caractère réducteur et donneur de protons qui se manifeste par des réactions rapides avec les espèces oxygénées réactives dont la production excessive (stress oxydant) est impliquée dans le développement de certaines pathologies dégénératives (maladies cardiovasculaires, cancers) (Dangles 2006). L'intérêt pour ces composés qui deviennent des éléments essentiels de l'alimentation en prévention et pour la santé humaine, est donc accru. Par ailleurs, leurs propriétés antioxydantes peuvent être mises à profit pour protéger des huiles polyinsaturées fortement oxydables (Klinkesorn 2005, Waterhouse 2014, Sekhon-Loodu 2013, Rupasinghe 2010 a/b/c/d, Yanishlieva 2001, Figueroa-Espinoza 2015).

Les antioxydants agissent selon différents modes:

- le transfert de l'atome d'hydrogène, où celui-ci réagit avec les radicaux peroxydes  $\text{ROO}^\bullet$  qui sont alors stabilisés sous forme d'hydro peroxydes ( $\text{ROOH}$ ) (Figure 13). Les antioxydants sous la forme  $\text{A}^\circ$  sont stabilisés par l'effet mésomère. Ils peuvent ainsi freiner la phase de propagation, en se complexant avec d'autres radicaux pour former des produits chimiquement stables.

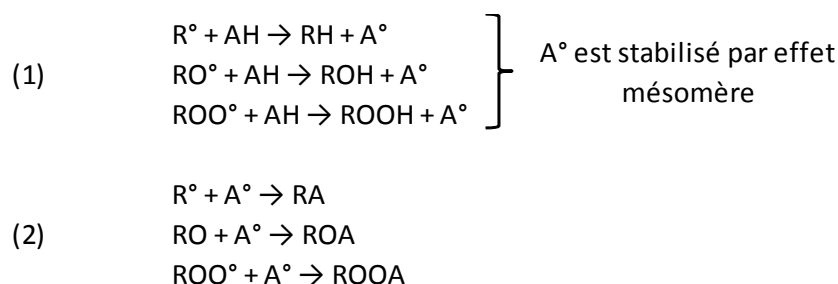


Figure 13 : Mode d'action des antioxydants par transfert d'un atome d'hydrogène.

- le transfert d'électrons, autre mécanisme réactionnel dans lequel un radical cation est d'abord formé (Figure 14). Il s'en suit une déprotonation rapide et réversible en solution.

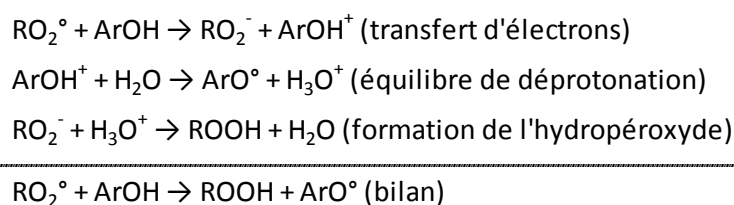


Figure 14: Mode d'action des antioxydants par transfert d'électron.

Les relations structure-activité suggèrent que le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est favorisé par plusieurs caractéristiques structurales. Par exemple, une structure ortho-dihydroxy sur le noyau B (catéchol) des flavonoïdes est responsable du pouvoir réducteur de la molécule ou le nombre de groupements hydroxyles et leur position a un impact sur le pouvoir réducteur des flavonoïdes (Fukumoto 2000, Sarni-Manchado 2006, Fiol 2012).

La capacité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux de 62 fruits, dont plusieurs variétés de pommes (*Green Delicious*, *Red Delicious*, *Rose Red*) ont été répertoriées par Fu *et al.* (2011). Il en ressort que les valeurs peuvent être très proches mais aussi très variables en fonction du type de pomme considéré. Les trois variétés de pommes contiennent des quantités de polyphénols comprises entre 58 mg équivalent acide gallique/100 g et 74 mg GAE/100 g et présentent une activité antioxydante non négligeable, de 5,9  $\mu\text{mol fe(II)/g}$  à 9,3  $\mu\text{mol fe(II)/g}$  ou de 4,2  $\mu\text{mol Trolox/g}$  à 5,5  $\mu\text{mol Trolox/g}$  selon la méthode utilisée. Pellegrini rapporte une capacité de 1,31 mmol Trolox/kg de matière fraîche (Pellegrini 2013). Des études plus poussées sur le lien entre polyphénols et activité antioxydante ont montré que l'épicatéchine et la procyanidine B2 sont les contributeurs principaux de l'activité antioxydante des pommes (Tsao 2005). De plus, l'activité antioxydante de l'épicatéchine est plus importante que la catéchine, celle

de la procyanidine B2 est plus importante que celle du dérivé B1. Cela implique que le groupe *cis* hydroxyl sur le carbone C3 du cycle C est plus efficace que la configuration *trans*. En moyenne, les activités antioxydantes des cinq groupes de polyphénols de la pommes décroissent dans l'ordre suivant : cyanidine-3-galactoside > procyanidines > quercétines glycosilées > acide chlorogénique > phloridzine.

Par ailleurs, les épidermes étant plus riches en polyphénols que les parenchymes, ils contribuent notablement au pouvoir antioxydant des fruits et des légumes entiers (Tsao 2005), constatation également confirmée pour les propriétés inhibitrices des radicaux libres (Mendoza-Wilson 2013). Les composés des épidermes ayant le plus grand potentiel de capture des radicaux libres sont les dérivés de la quercétine (principalement –galactoside et –glucoside), les procyanidines B2 et la cyanidine-galactoside (Tow 2011).

## **b/ Effet santé**

Les polyphénols et les antioxydants prennent une place croissante dans le marketing alimentaire qui s'appuie sur leurs effets bénéfiques pour la santé. En effet, au niveau de la santé, leur rôle d'antioxydant naturel suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention de plusieurs maladies grâce à différentes activités mises en évidence lors d'études cliniques ou *in vivo* : par exemple, l'activité contre les cancers et les maladies cardiovasculaires (Garcia-Lafuente 2009, Veeriah 2006, Denny 2007, Peng 2003, Boateng 2012), l'activité biologique (Kroon 2004, Xia 2010) et l'activité anti-inflammatoire (Muanda 2010). Des extraits de plantes australiennes riches en polyphénols, par exemple, ont une action cytoprotective et pro-apoptotique (Sakulnarmrat 2013) et des extraits de canneberges riches en flavonoïdes inhibent les cellules tumorales (Ferguson 2004). Pour le raisin, la présence des anthocyanes, procyanidines et resvératrol est responsable d'effets anticancéreux et antifongiques (Xia 2010).

En ce qui concerne la pomme, de nombreux effets bénéfiques ont été montrés (Roupas 2010, Serra 2012). Les flavonoïdes de la pomme inhibent les cellules HT-29 (Veeriah 2006) et ont un effet sur le métabolisme du cholestérol (Thilakarathna 2012). La consommation de pommes *Marie Ménard* riches en polyphénols permet de réduire l'inflammation du colon de rats transgéniques (Castagnini 2009). Plus précisément, les polyphénols de pelures de pommes ont un effet antioxydant et anti-inflammatoire sur les cellules Caco-2 (Denis 2013), effets qui pourraient être associés à la présence de flavonoïdes qui inhibent la peroxydation lipidique dans ces cellules (Peng 2003). Les épidermes de pommes fraîches ont une capacité d'inhibition des cancers (Ding 2004, Gerhauser 2008, Boateng 2012). Des coproduits de pommes riches en polyphénols présentent eux aussi un effet antiprolifératif (Tow 2011, Fernandes 2013). Outre les polyphénols, d'autres molécules peuvent participer aux activités biologiques testées : les triterpénoïdes présents dans des épidermes de pommes (Szakiel 2012, Serra 2010b), les polysaccharides qui agissent sur



les cellules cancéreuses du colon (Li 2013, Liu 2010) ou la vitamine C, le potassium et les fibres de la pomme qui ont une action hypocholestérolémiant (Demigné 2003). Une molécule particulière a une capacité anticancéreuse démontrée ces dernières années, c'est l'épicagallocatéchine gallate qui réduit la viabilité tumorale et induit l'apoptose de cellules HT-29 (Sanchez-Tena 2013, Kalaiselvi 2013, De Amicis 2013).

L'étude de la biodisponibilité des polyphénols dans le corps humain complète les recherches. Par exemple, Manach *et al.* (2005) rapportent l'ordre des différents polyphénols absorbés par le corps humain. D'autres auteurs expliquent comment les polyphénols sont absorbés par le corps humain, les mécanismes de transformation d'aglycones en méthyle, ainsi que leur assimilation dans l'intestin jusqu'au métabolisme systémique (Scalbert 2000, Zibera 2012, Dauchet 2008, Kahle 2011, Vieira 2012).

### **I.3. Dégradation des polyphénols par réaction enzymatique**

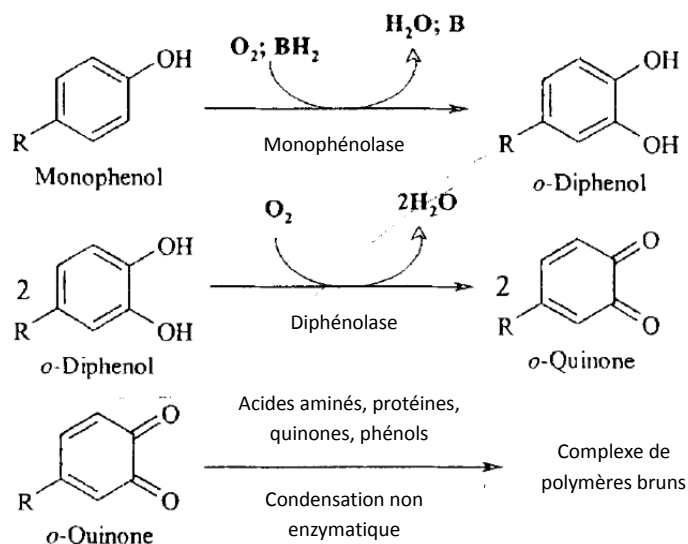
Le brunissement enzymatique est le principal facteur à l'origine d'une détérioration de la qualité des produits transformés de la pomme tels le jus et les tranches fraîches.

#### **I.3.1. Oxydation enzymatique**

L'oxydation des polyphénols est le phénomène responsable du brunissement des fruits et légumes. Cette oxydation est soit enzymatique, soit chimique. Dans le cas du brunissement enzymatique, les enzymes responsables de l'oxydation sont les polyphénoloxydases (PPO) (EC 1.14.18.1) et les peroxydases (POD) (EC. 1.11.17). Le rôle des peroxydases dans le brunissement enzymatique est limité par la biodisponibilité des peroxydes hydrogènes (Robards 1999). Pour que la réaction d'oxydation ait lieu, il est indispensable que ces enzymes -à localisation cytosolique ou membranaire- soient mises au contact des polyphénols -à localisation principalement vacuolaire- (Bernillon 2004). Les réactions enzymatiques ont donc lieu lorsque les tissus des fruits sont altérés, par exemple lors de traumatismes mécaniques (broyage, récolte, pelage, découpe), technologiques (conservation au froid, congélation décongélation, irradiation) ou de troubles physiologiques (infections fongiques). Quand les fruits et les légumes sont pelés ou coupés, les enzymes contenues dans les cellules végétales sont libérées.

En présence d'oxygène, les oxydases (catéchol oxydase, ascorbate oxydase, phénol oxydases...) sont actives seulement au cours du premier stade de conversion des groupes phénol ou ènediol en composés carbonylés (Figure 15). La réaction qui suit n'est pas catalysée par les enzymes, mais sa vitesse dépend de celle du premier stade, les groupes carbonyle formés peuvent réagir avec des amines pour produire des polymères rouges et bruns (cas de l'oxydation de l'acide ascorbique) ou entraîner des cyclisations puis des polymérisations en pigments roses puis bruns

(cas de l'oxydation des polyphénols en orthoquinone puis en mélanines) (Venkatachalam 2012). Ces composés bruns sont responsables de la couleur brune des végétaux lors de leur oxydation et permettent de caractériser ce brunissement par des paramètres colorimétriques CIELab. Effectivement, lors du brunissement, les paramètres  $L^*$  et  $b^*$  décroissent alors que le paramètre  $a^*$  augmente (Altunkaya 2008).



*Figure 15: Représentation schématique des processus de brunissement enzymatique et non enzymatique (Yoruk 2003).*

Les principaux substrats des polyphénoloxydases sont les composés phénoliques présentant un groupement ortho-diphénolique (Guyot 2003) tel que l'épicatéchine, la catéchine et les procyanidines (Amaki 2011). Les acides hydroxycinnamiques dont l'acide chlorogénique, sont préférentiellement oxydés et dégradés par la PPO. D'autre part, la phloridzine est oxydée de façon particulière par la PPO car elle est d'abord convertie totalement en composés colorés intermédiaires, qui sont ensuite convertis en pigments jaunes (Guyot 2007).

### I.3.2. Solutions à l'oxydation des matrices végétales

Les principales solutions pour limiter le brunissement enzymatique fonctionnent sur trois mécanismes :

- l'abaissement du pH,
- la diminution de la teneur en oxygène,
- la dénaturation par la température.

Garcia et Barrett (2002) énumèrent les techniques les plus utilisées en agroalimentaire pour contrer le brunissement. Le pH optimal de fonctionnement de la PPO est de pH 4,5 à 6,5, l'utilisation d'agents acidifiants permet donc d'abaisser le pH si possible en dessous de pH 3 pour inactiver de façon irréversible l'enzyme. D'autres techniques agissent sur la réduction de l'oxygène pour empêcher la réaction enzymatique : par exemple, l'immersion dans un sirop de glucose qui retarde la diffusion de l'oxygène dans le fruit, l'utilisation d'une atmosphère modifiée (Rocculi 2004) ou l'abaissement de la température de préparation et de transformation des végétaux provoquant une diminution des échanges gazeux donc des réactions enzymatiques. A noter que d'un point de vue industriel, la déshydratation osmotique par immersion dans un sirop de sucrose est une méthode simple permettant de préserver les aliments en diminuant l'eau contenue et en augmentant la concentration en soluté (Quiles 2005). La faible activité observée de la PPO sur un parenchyme déshydraté de pommes par osmose est attribuée à la pénétration des agents osmotiques dans les espaces intercellulaires, entraînant une faible humidité et limitant la concentration en O<sub>2</sub> dans l'environnement immédiat de l'enzyme.

L'ajout d'agents acidifiant tels que l'acide ascorbique ou l'acide citrique réduit le brunissement de tranches de pommes (Chiabrando 2012, Jeong 2008, Son 2001). L'acide ascorbique agit comme un antioxydant avec lequel l'oxygène réagit préférentiellement. Il n'inhibe donc pas directement la PPO, mais il réduit les o-quinones formées par l'enzyme en diphénol originel selon le mécanisme dit de réaction de désactivation (Altunkaya 2008). Sur des jus de pommes *Golden Delicious* stockés 2 jours à 25 °C (Ozoglu 2002), un traitement à base d'acide ascorbique, de cystéine et d'acide cinnamique a réduit l'action des enzymes et amélioré l'activité antioxydante. Le couplage entre les traitements augmente souvent l'efficacité, ainsi que l'ont montré Chow *et al.* ou Jang *et al.*, en réalisant respectivement un traitement thermique à 60 °C (Chow 2011) ou un traitement par ultrasons (Jang 2011) couplé à un traitement à l'acide ascorbique de pommes fraîches. La cystéine est également un antibrunissement actif (Amaki 2011), qui peut présenter un effet même supérieur à celui des acides plus conventionnels (Altunkaya 2008). Testée comme inhibiteur de la PPO de laitue, la cystéine (5–10 mM) s'est révélée être plus efficace que l'acide ascorbique (10–20 mM), l'acide oxalique (0,1–0,14 mM) ou l'acide citrique (0,1–0,14 mM). Par ailleurs, l'acide ascorbique et la cystéine ont augmenté l'activité antioxydante des laitues, alors que les acides citrique et oxalique n'ont pas eu d'effet. Les sulfites sont également connus pour prévenir le brunissement (Kumar 2012). Cependant, le taux de sulfites de sodium ou potassium est réglementé et ne doit pas dépasser 200 mg/kg de poids frais selon la réglementation française et sont même interdits en Australie.

Outre ces additifs, d'autres molécules présentes dans les végétaux peuvent avoir des activités inhibitrices de la PPO. Tan *et al.* (1995) observent que les produits de la réaction de Maillard (sucres et acides aminés) inhibent plus ou moins efficacement les enzymes sans pour autant

présenter une étude comparative avec des additifs plus conventionnels. Les actifs végétaux semblent même aussi efficaces que les agents synthétiques (Hakim 2012). Le fruit du rosier, dont l'acide majoritaire est l'acide citrique, ou la grenade, riche en vitamine C et en polyphénols ont montré qu'ils étaient des inhibiteurs naturels de la PPO de champignon et d'artichaut (Zocca 2011). Des bananes fraîchement coupées ont été conservées dans des jus de fruits sucrés (Melo 2014), l'abaissement de pH apporté par le jus de fruit (ici, la passion) et la déshydratation osmotique apportée par le sucrose ont contribué à réduire l'activité enzymatique (l'effet des antioxydants du jus de passion n'est cependant pas mis en avant).

L'effet de traitements thermiques sur l'inactivation de la PPO est bien documenté dans la littérature. D'une façon générale, la dénaturation de la PPO de pommes augmente avec la température et le temps de traitement (solutions dépourvues de phénols libres et d'acide ascorbique) : à 50 °C, l'activité résiduelle de la PPO est de 25 % après 120 min de traitement alors que son inactivation complète est obtenue après 10 min de traitement à 70 °C et seulement 3 min à 80 °C (Aka 2013). L'influence de la température a également été étudiée par Buckow *et al.* (2009). Un traitement de 50 °C, 55 °C et 60 °C conduit à une inactivation de la PPO de l'ordre de 40 % à 84 % pour un traitement de 10 min. L'incubation à plus forte température (65 °C ou 70 °C) permet de réduire significativement la durée de traitement. En effet, plus de 95 % de la PPO est inactivée en 10 min à 65 °C et 1 min à 70 °C. Une incubation à 60 °C pendant 160 min a également inactivé totalement la PPO (Chow 2011). Cependant, l'efficacité du traitement dépend aussi de facteurs inhérents aux produits (Zhu 2010). Ainsi, la finesse des tranches mène à une inactivation plus rapide des enzymes. La POD semble plus résistante que la PPO car une température de 75 °C, sur des tranches de 5 mm d'épaisseur conduit à une activité résiduelle de la POD de 10 % contre moins de 1 % pour la PPO.

#### **I.4. Impact des procédés de transformation agroalimentaire sur les polyphénols**

Les opérations de transformation de la pomme en produits alimentaires sont susceptibles d'affecter les teneurs en micro-constituants et donc la qualité nutritionnelle des produits finis. Par effets indirects, ils vont également impacter les caractéristiques des coproduits que l'on souhaite valoriser. En plus d'être dégradés par des réactions d'oxydation, comme les réactions enzymatiques dont nous avons parlées précédemment, les micro-constituants sont généralement sensibles à la chaleur et à la lumière. Chanforan *et al.* (2010) ont, à partir de résultats sur la tomate, proposé diverses stratégies pour préserver au mieux l'intégrité des composés nutritionnels d'un aliment ou favoriser l'apparition de composés néoformés positifs.

Les traitements thermiques sont fréquents dans la transformation des végétaux. Ils peuvent être conduits à des fins de cuisson, de pasteurisation, de stérilisation ou bien de séchage d'un matériau à des fins de conservation.

### ***Cuisson-traitements thermiques***

Dans sa thèse, Muriel Colin-Henrion (2008) a évalué la quantité de polyphénols et l'activité antioxydante au cours de chaque étape de transformation de la pomme fraîche en compote. La cuisson provoque une augmentation de la teneur en composés phénoliques quel que soit le composé. En effet, la température peut avoir libéré des molécules et comme l'enceinte est close, ceux-ci se retrouvent dans la purée cuite. L'action de la PPO est par ailleurs peu probable dans ce cas présent car l'enzyme est rapidement inactivée. La pasteurisation, qui dure de 2 à 3 minutes à 85 °C n'engendre aucune dégradation notable, hormis pour la quercétine et la catéchine qui tendent à augmenter. Cela peut s'expliquer par le fait que la dégradation thermique des hétérosides de quercétine aboutit au clivage entre le sucre et la partie aglycone (la quercétine) et augmente ainsi la quantité de quercétine dosée. Le pH du produit (3,4 à 4,0) et la température appliquée (90 °C) pourraient avoir contribué à l'hydrolyse acide. En ce qui concerne l'évolution de la capacité antioxydante, les extraits phénoliques de pomme fraîche et de compote présentent un potentiel similaire de  $2,8 \pm 0,2$  mmol de Trolox/kg de matière fraîche pour la pomme non pelée et  $2,6 \pm 0,2$  mmol de Trolox/kg pour la compote. Les travaux ne mettent en évidence ni de dégradation très importante des composés phénoliques ni de l'activité antioxydante entre la pomme fraîche et la compote. A noter que l'évolution d'une teneur peut s'expliquer par une dégradation, avec en parallèle l'augmentation d'un phénol produit lors de la réaction, ou bien par une libération des composés dans le milieu.

Sur les poires, Renard *et al.* (2005) ont étudié plus précisément l'évolution de la teneur et la répartition des flavan-3-ols et des acides hydroxycinnamiques entre les jus et les fruits lors de leur cuisson. Les flavan-3-ols sont retenus dans le tissu des poires alors que les acides hydroxycinnamiques sont libérés dans l'eau de cuisson. Les évolutions montrent une diminution des teneurs causée par l'oxydation des polyphénols. Les teneurs en polyphénols solubles sont affectées de façon variable selon le mode de cuisson et le légume considéré. En étudiant deux modes de cuisson (immersion dans l'eau et cuisson vapeur) de six légumes, Barkat *et al.* (2012) ont observé une augmentation des teneurs en polyphénols lors de la cuisson vapeur (concentration des polyphénols dans les tissus car les cellules ont éclaté et libèrent les polyphénols) et une diminution lors de la cuisson par ébullition (libération des polyphénols solubles dans les eaux de cuisson).

Les jus de fruits peuvent faire l'objet d'une pasteurisation par la pression, à charge pour le traitement de ne pas dégrader les polyphénols. Un traitement de 5 minutes à 20 °C et 400 MPa a permis d'inactiver la PPO de pommes (Buckow 2009). En revanche, le blanchiment à 95,5 °C pendant 5 min réduit drastiquement les anthocyanines de mûres et le remplissage à chaud des

boissons dans les bouteilles détruit les éllagitannins (Gancel 2011). Les produits finis montrent une réduction des concentrations en anthocyanes de 52 % et une chute de 47 % de la capacité antioxydante. Les polyphénols de la fraise sont également dégradés par la pasteurisation, c'est une étape critique. Elle est cependant nécessaire pour inactiver les enzymes des fruits (Klopotek 2005) : une perte de 30 % des polyphénols associée à une activité antioxydante faible est constatée dans la fabrication d'un jus de fraises.

L'impact des traitements thermiques semble donc très dépendant des matrices végétales étudiées et transformées. Arabshahi (2007) compare l'impact d'un traitement thermique de 100 °C pendant 15 min sur trois matériels de plantes, sources naturelles d'antioxydants : les feuilles de pison, de menthe et des carottes. L'activité antioxydante dans les feuilles de pison décroît significativement, alors qu'aucune différence n'est observée pour les carottes et qu'une augmentation significative est perceptible pour les feuilles de menthe.

### ***Séchage- déshydratation***

Outre les traitements thermiques de cuisson ou de pasteurisation, les végétaux peuvent également être soumis à des méthodes de déshydratation et de séchage. Le séchage de pommes blanchies à des températures supérieures à 60 °C cause une perte des épicatechines, des acides caféiques et des acides p-coumariques, associée à une perte significative de l'activité antioxydante (Heras-Ramírez 2011). D'un autre côté, en étudiant plus précisément l'effet de la température et de la vitesse de séchage sur la qualité des tranches de pommes *Granny Smith*, Vega-Galvez *et al.* (2012) ont noté une dégradation des polyphénols totaux mais pas de différence dans l'activité antioxydante de pommes séchées à 40 °C ou 80 °C. Ceci est expliqué par le développement de produits issus des réactions de Maillard, contribuant ainsi à la génération et à l'accumulation de composés antioxydants. Le séchage des fruits entraîne une dégradation de leurs qualités nutritionnelles (vitamine C et polyphénols totaux) et de l'activité antioxydante à fortes températures (80-90 °C) ou lors de long traitements à moindre température (50-60-70 °C) (Lopez 2012). Lors d'un séchage au four de pommes, des pertes d'épicatechine, de cyanidine-galactoside, de phloridzine et des quercétines glycosides sont observées, ainsi qu'une perte d'activité antioxydante à 70 °C (Joshi 2011). La perte est expliquée par un brunissement enzymatique des tranches de pommes qui sèchent sous air, la catéchine et l'épicatechine étant les substrats préférentiels de l'enzyme. Lavelli *et al.* (2011) ont comparé un séchage conventionnel à un séchage sous vide de marcs de pommes industriels (*Red Delicious* et *Golden Delicious*). Le séchage à 60 °C semble meilleur que le séchage sous vide à 40 °C pour la rétention des anthocyanes et des flavonones sans qu'il n'y ait de différence significative pour les flavonols, les dihydrochalcones et les acides hydroxycinnamique. Contrairement aux observations précédentes,



le séchage sous air a engendré la perte de 44 % des quercétines glycosilées alors que le séchage sous vide a protégé les polyphénols de l'oxygène (Schulze 2014).

D'autres matrices végétales se comportent également comme la pomme, cependant les influences du séchage et de la déshydratation varient en fonction des types d'antioxydants présents. Dans le cas de la myrtille (Lopez 2010), un séchage long associé à une faible température (50-70 °C) contribue à diminuer l'effet protecteur des polyphénols envers l'oxydation des cellules. De façon surprenante, la déshydratation à plus hautes températures (80 et 90 °C) conduit à une plus grande activité antioxydante et à une plus forte concentration en polyphénols. Cependant, comme pour la pomme (Lopez 2012), ces teneurs peuvent être imputables à la génération d'autres composés antioxydants avec divers degrés d'activité antioxydante. De la même façon, une température de séchage entre 50 °C et 90 °C augmente les propriétés antioxydantes du poivron rouge (Vega-Galvez 2009).

La lyophilisation est une autre technique de dessiccation qui procède par sublimation de l'eau contenue dans un produit congelé. Les polyphénols de tomates rouges ne sont pas affectés par la lyophilisation, alors qu'une décroissance de 30 % est observée à partir de tomates jaunes (Georgé 2011). Cette différence d'impact est due au lycopène présent dans les tomates rouges qui protège les polyphénols. D'un autre côté, lors de la déshydratation de tomates par lyophilisation ou séchage à air chaud (Chang 2006), les taux de polyphénols totaux augmentent respectivement de 2,6 % et 5,9 % durant la lyophilisation et de 13 % et 29 % pour le séchage sous air, par rapport au fruit frais. L'augmentation est due à la libération des polyphénols de la matrice durant le traitement. Par rapport à un séchage sous vide, la lyophilisation d'épidermes de mangues a permis de conserver un meilleur taux de polyphénols (Sogi 2013).

### ***Stockage – conservation***

Les polyphénols sont généralement stables au cours de la conservation des pommes, y compris pour des stockages prolongés de 4 à 12 mois (Golding 2001, MacLean 2006, Van der Sluis 2001). Cependant, Sacchetti *et al.* (2008) déterminent l'activité antioxydante de sept variétés de pommes fraîches ou en purée et observent que toutes les activités antioxydantes augmentent pendant le premier mois de stockage puis déclinent par la suite. Lata *et al.* (2008) comparent le stockage sous atmosphère normale et contrôlée. Ils en concluent que l'atmosphère modifiée conduit à une augmentation du pool d'antioxydants (ascorbate, thiols et polyphénols). L'augmentation initiale des polyphénols dans l'épiderme coïncide avec la respiration et l'action de l'éthylène dans le mûrissement. Les concentrations d'épicatéchine et notamment de la phloridzine sont stables, comparées à celles des autres antioxydants. L'augmentation ou la diminution n'excède pas les 10 %, donc l'effet du stockage semble faible.

Les anthocyanes, les cyanidines-glucoside et les malonyl-glucoside de mûres sont affectées lors du stockage à faible température (5 °C) (Gancel 2011). Après 35 jours de stockage à 5 °C, la perte moyenne est de 15 %. Supapvanich (2011) montre que la température de stockage affecte significativement la capacité antioxydante et le contenu en acide ascorbique. A 7 jours, cette capacité est plus élevée à 4 °C qu'à 12 °C. Une température de stockage basse permet donc de préserver les composés phénoliques.

D'autre part, les polyphénols sont stables lors de la congélation. Il n'y a pas de pertes en polyphénols totaux ni à la congélation ni durant le stockage de jus de framboise (De Ancos 2000). Un stockage à -15 °C n'affecte pas non plus la capacité antioxydante de fruits tels que les pommes, les fraises, les poires et les figues sur 90 jours (Jeusti Bof 2012).



## **II. Extraction des polyphénols : techniques conventionnelles & CO<sub>2</sub> supercritique**

L'extraction des polyphénols à partir des matrices naturelles a pris de l'ampleur ces dernières années de façon à pouvoir les isoler, les purifier et les manipuler par la suite. Il n'y a pas de méthode unique ni standardisée à l'extraction des polyphénols, notamment en raison de leur diversité (Herzi 2013, Ignat 2011). D'une façon générale, l'utilisation de solvants organiques lors de l'extraction des végétaux devient un problème pour l'environnement, de ce fait, d'autres techniques alternatives de types physiques, enzymatiques et par fluides supercritiques tendent à émerger (Wang 2006, Acosta-Estrada 2014). Ces méthodes utilisent d'une façon plus raisonnée les solvants (volume, type) et l'énergie, en réduisant les durées d'extraction afin d'en limiter l'impact environnemental et économique.

Nous présentons dans la suite de cette étude bibliographique, un résumé des techniques conventionnelles par solvants organiques et des techniques alternatives en traitant plus particulièrement l'extraction par fluides supercritiques.

### **II.1. Extraction par solvants**

Dans ce travail, nous ne réaliserons que des extractions à partir de solides, c'est donc ce type qui est décrit par la suite. Les techniques classiques d'extraction sont l'hydrodistillation, l'extraction au soxhlet, la macération, et plus récemment, l'extraction par solvants organiques pressurisés, même si cette dernière technique est utilisée essentiellement à des fins analytiques et non en production industrielle. Toute extraction, qu'elle soit conventionnelle ou alternative, repose sur un principe de diffusion (à plusieurs échelles), lui même tributaire d'un gradient de concentration donc de la solubilité dans le milieu extractant. Cette solubilité est définie par : la diffusion du solvant au sein de la matrice solide, la dissolution du soluté dans le solvant, la diffusion du soluté au sein de la matrice solide vers la surface, et transfert par convection ou diffusion du soluté contenu dans la solution près du solide vers la masse restante du solvant.

L'extraction liquide-solide est une opération de transfert de masse entre un solide (matrice) et un solvant liquide, solvant qui présente une affinité importante pour les composés que l'on cherche à extraire. Puisque l'extraction est un processus régi par un transfert de matière, toute action visant à augmenter la surface d'échange (telle que le broyage), le coefficient de diffusion (telle que la température), la concentration (nature du solvant, renouvellement du solvant) ou à améliorer le contact entre la matrice et le solvant (pression, nature du solvant) entraînera une augmentation de la quantité extraite. Néanmoins, un solvant est rarement sélectif, et s'il permet bien d'extraire les molécules d'intérêt, il conduit généralement à la co-extraction d'autres molécules.

L'efficacité de l'extraction est donc dépendante des conditions du process et notamment des paramètres de température, du ratio liquide/solide, du débit de solvant, de la taille des particules et

de la nature du solvant (Ignat 2011). Les solvants utilisés pour l'extraction des polyphénols sont divers : l'eau ou les mélanges aqueux, acidifiés ou non, l'éthanol, le méthanol, l'acétone, autres solvants organiques et/ou chlorés (Tableau 8). Les inconvénients liés à l'extraction par solvant sont des temps d'extraction souvent longs, la nécessité de grands volumes de solvant et l'utilisation de températures élevées qui tout en favorisant les cinétiques d'extraction peuvent néanmoins conduire à la décomposition des molécules actives (thermosensibles).

**Tableau 8** : Solvants organiques utilisés dans l'extraction des polyphénols (Ignat 2011).

Polyphénols	Solvant
Acides phénoliques, flavonols, anthocyanes	Acétate d'éthyl
Anthocyanes, acides phénoliques, catéchines, flavonone, flavones, flavonols, procyanidines, acides ellagique, rutine, acides chlorogéniques	Méthanol et différentes formes aqueuses (50-90% v/v)
Anthocyanes, flavonols, acides phénoliques libres	Ethanol et différentes formes aqueuses (10-90% v/v)
Flavonols, acides phénoliques libres	Chloroforme
Flavonols, acides phénoliques	Ether diéthyl
Proanthocyanidines, acides phénoliques	Eau chaude (80-100°C)
Tannins, acides phénoliques liés	NaOH (2-10N)
Polyphénols, acides phénoliques	Ether de pétrole
Flavonols, acides phénoliques, acides hydroxycinnamiques, coumarines, flavonols, xanthones	Acétone/eau (10-90% v/v)
Flavonols, acides phénoliques, anthocyanes	n-hexane, isooctane, acétate d'éthyl
Polyphénols de feuilles d'olive, oleuropéine, rutine	acétone, éthanol et différentes formes aqueuses (10-90% v/v)
Flavonols, quercétine-3,4'-diglucoside, quercétine 4'-monoglucoside	Méthanol/eau 70% v/v

D'après la littérature, le méthanol est le solvant le plus efficace dans l'extraction des polyphénols et améliore de 50 % l'extraction des anthocyanes de pulpe de raisins (Ignat 2011). Par rapport à l'eau, le méthanol et l'acétone extraient plus de polyphénols du marc de pommes (Reis 2012). L'eau extrait les acides hydroxycinnamiques (acide chlorogénique, acide caféoylquinique, acide féruloïlquinique) et les flavonoïdes (flavonols, flavanols, dihydrochalcones et les flavones) mais ne suffit pas à extraire les quercétines glycosilés et les flavanols. Pour les polyphénols de dattes (Telli 2010), les résultats de l'optimisation montrent que le méthanol est plus efficace que l'éthanol. L'ajout d'eau au solvant améliore le rendement, mais la concentration des composés non phénoliques augmente ce qui conduit à la diminution du taux de polyphénols dans l'extrait. Enfin, le rapport solide/liquide et la prolongation du temps d'extraction affectent de façon significative la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux.

La température peut contribuer à améliorer l'extraction des antioxydants mais peut également contribuer à leur dégradation. Un effet positif de la température sur la cinétique d'extraction et la diffusivité des composés phénoliques a été évalué à partir de la fraise (Cacace 2003) et des anthocyanes à partir de la carotte noire (Turker 2005). L'augmentation de la température favorise l'extractibilité des polyphénols en augmentant leur solubilité et leur coefficient de diffusion (Pinelo 2006), mais l'instabilité des polyphénols limite la température

d'extraction à 50 °C (Cacace 2003). Pinelo *et al.* (2008) ont étudié l'influence de la température, du solvant et de la granulométrie sur l'extraction de polyphénols de pommes *Golden Delicious*, qui ont été quantifiés de façon individuelle. Une augmentation de la température, une fine granulométrie et la présence d'éthanol dans le solvant augmentent l'extraction des polyphénols suivants : l'épicatéchine, la procyanidine B2, la rutine, l'acide chlorogénique, la phloridzine et les dérivés de phloridzine. Néanmoins, les effets sont interdépendants : ainsi, pour l'acide chlorogénique, une meilleure extraction est observée en milieu aqueux sur de petites particules, alors qu'en éthanol, l'extraction est meilleure à partir de plus grosses particules.

Un frein à l'extraction, souvent négligé, est la possible interaction physicochimique de la molécule à extraire avec sa matrice, comme l'illustre le cas des tannins. Au sein de la paroi végétale, une partie des tannins est piégée entre les fibrilles de cellulose et d'hémicellulose qui constituent la trame rigide de la paroi, alors qu'une autre partie est complexée avec les pectines et la paroi (Lacampagne 2010). Les tannins sont plus ou moins intégrés dans le maillage pariétal en fonction de leur degré de polymérisation : plus le degré de polymérisation des tannins est important, plus ils sont retenus dans les parois (Renard 2005), ce qui limite alors leur extractibilité (Amrani 1994). Les liaisons peuvent être détruites par hydrolyse acide ou basique (Stalikas 2007). Le traitement acide dégrade néanmoins les polyphénols dont les flavonols (Moussa-Ayoub 2011), alors que l'hydrolyse alcaline semble avoir moins d'impact sur les polyphénols (Acosta-Estrada 2014).

## II.2. Méthodes physiques

A côté des méthodes conventionnelles, d'autres alternatives tendent à se développer dans l'objectif d'améliorer l'efficacité du procédé d'extraction dans un contexte de développement durable (Acosta-Estrada 2014).

Les ondes sonores, qui ont une fréquence supérieure à 20 kHz, sont des vibrations mécaniques dans un solide, liquide ou gaz. Pingret *et al.* (2012) soumettent un gâteau de presse de pommes aux ultrasons pour produire des extraits riches en antioxydants (0,764 W/cm<sup>2</sup>, 40 °C, 40 min). La quantité de polyphénols totaux augmente de 30 % après le traitement aux ultrasons et les extraits présentent une meilleure activité antioxydante.

Les microondes sont des radiations électromagnétiques avec une fréquence de 0,3 à 300 GHz. Les microondes sont transmises comme des ondes et peuvent pénétrer dans le matériel biologique et interagir avec les molécules polaires telles que l'eau. Un traitement de tomates par microondes à 96,5 °C pendant 1 à 2 min, optimise l'activité antioxydante et la quantité des composés phénoliques extraits (Li 2012). Une amélioration similaire est observée sur des coproduits d'oignons où le rendement d'extraction des flavonols et la capacité antioxydante des extraits a été augmentée par l'utilisation de microondes (Zill-e-Huma 2010).

La fermentation de coproduits de pommes par *Phanerocheate chrysosporium* permet d'obtenir des extraits contenant de 5,78 à 16,12 mg équivalent acide gallique/g matière sèche selon les conditions, et augmente jusqu'à 17,2 mg équivalent acide gallique/g matière fraîche avec le marc fermenté (Ajila 2011).

### **II.3. CO<sub>2</sub> supercritique**

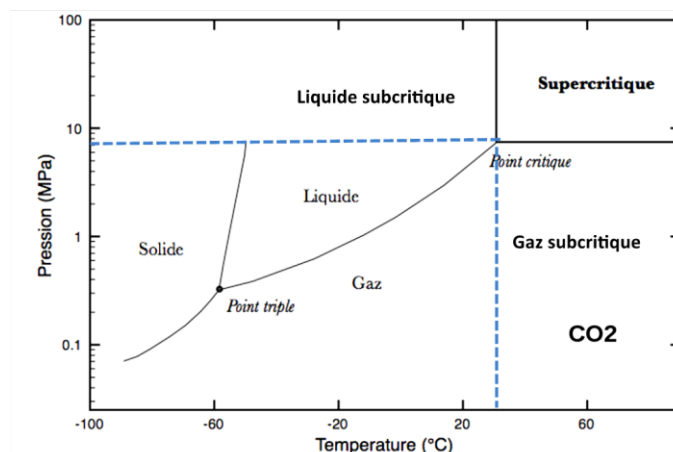
L'extraction par fluides supercritiques a été développée dans les années 1980, avec un regain d'intérêt ces dernières années pour l'extraction des polyphénols à partir de sources végétales. La faible viscosité des fluides supercritiques leur confère une grande capacité à diffuser, tandis qu'une bonne densité leur donne un pouvoir de solvation élevé, pour autant que des molécules apolaires soient concernées. Les dégradations telles que les oxydations ou les isomérisations devraient être minimisées puisque l'extraction a lieu en absence d'oxygène et de lumière.

#### **II.3.1. Domaine supercritique et propriétés**

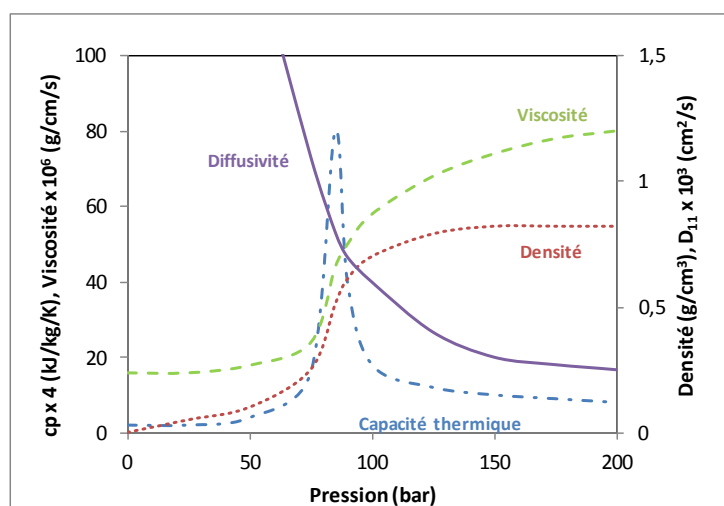
Un corps pur existe sous trois états : solide, liquide et gazeux. Dans le diagramme température-pression (Figure 16), les régions correspondant à ces trois états sont séparées par les courbes de changement d'état qui sont concourantes au point triple. La courbe de vaporisation (liquide-gaz) présente un point terminal, dit point critique (PC) correspondant à un couple particulier de pression-température ( $P_c$ ,  $T_c$ ). Au-delà de ce point critique, l'état liquide et la vapeur ne sont plus discernables, nous parlerons de domaine supercritique. Un fluide porté dans ces conditions présente des propriétés très particulières sur lesquelles vont reposer bon nombre des procédés développés aujourd'hui.

Les fluides supercritiques ont des caractéristiques physico-chimiques intermédiaires entre celles des gaz et des liquides. Par comparaison avec les solvants liquides, les fluides supercritiques présentent les avantages principaux suivants:

- 1/ le pouvoir solvant des fluides supercritiques est très flexible et dépend de leur masse volumique, c'est à dire qu'il est ajustable en modifiant la température et/ou la pression ;
- 2/ la tension superficielle des fluides supercritiques est très faible, ils ont une diffusivité élevée et une viscosité faible (Figure 17), ce qui favorise le transfert de matière et permet une pénétration facile dans les pores d'une matrice solide.



*Figure 16 : Diagramme d'état du CO<sub>2</sub> pur, précisant le domaine supercritique et les régions de gaz et liquide subcritiques. Figure réalisée à partir du diagramme extrait de <http://planet-terre.ens-lyon.fr/article/fluide-supercritique> (R. Bouchet Bert-Manoz).*



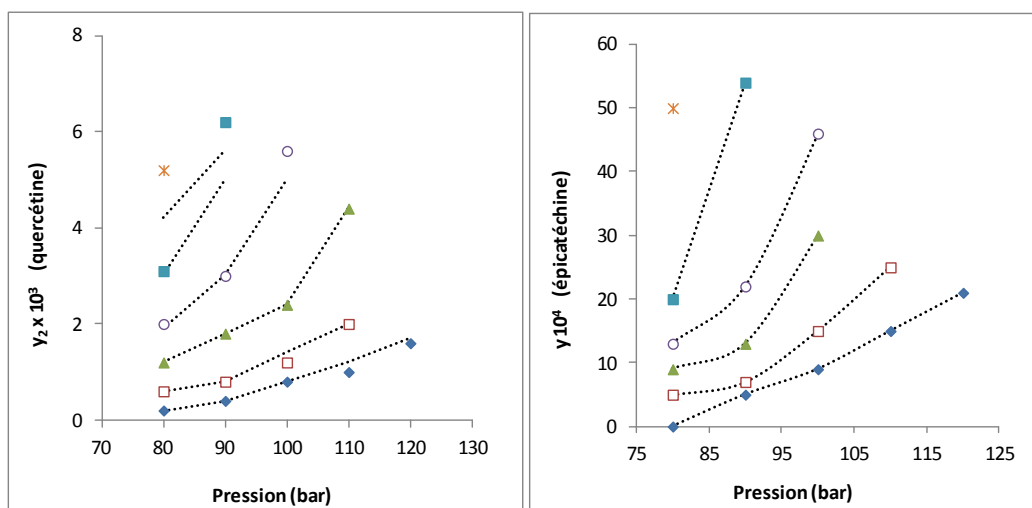
*Figure 17 : Variation des propriétés physicochimiques du CO<sub>2</sub> proche des conditions critiques (Subramaniam 2002). Températures de 50 °C pour  $D_{11}$  et 37 °C pour la capacité thermique, la densité et la viscosité.*

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est le fluide le plus largement utilisé en raison de ses coordonnées critiques facilement accessibles ( $T_c = 31\text{ °C}$  et  $P_c = 7,3\text{ MPa}$ ), de sa faible toxicité et réactivité, de son inflammabilité, de sa disponibilité y compris à haute pureté et de son faible coût. C'est un solvant de choix pour les industries alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques pour lesquelles l'extraction et le fractionnement doivent être conduits à des températures aussi faibles que possible afin d'éviter la dégradation des molécules et qui exigent l'élimination de toute trace de solvant organique dont l'innocuité est sujette à caution pour certains.

Pour autant, le CO<sub>2</sub> supercritique n'est efficace que pour l'extraction des molécules apolaires et par conséquent ne convient pas pour les molécules polaires. Avec une polarité comparable à celle

de l'hexane, le  $\text{CO}_2$  ne peut dissoudre raisonnablement ni les molécules portant de nombreuses fonctions hydroxyles, amines et acides, telles que les sucres, les polyphénols, ni les molécules de poids moléculaire élevé, telles que les protéines, les polymères... A l'inverse, des molécules hydrophobes telles que les acides gras, les stérols, les caroténoïdes ou d'autres composés lipophiles sont relativement solubles dans le  $\text{CO}_2$ . Pour palier à cette faible capacité de solubilisation, nous pouvons jouer sur le couple pression/température (des dispositifs montant à 70 ou 100 MPa apparaissent sur le marché) et/ou ajouter un modificateur (appelé cosolvant) qui sera choisi en fonction des interactions possibles avec les molécules à extraire. N'importe quel solvant organique peut être mélangé au  $\text{CO}_2$  dans diverses proportions. Néanmoins, les propriétés de ce mélange ne seront plus celles du  $\text{CO}_2$  pur, mais seront globalement intermédiaires entre celles du cosolvant et celle du  $\text{CO}_2$ . En termes de procédé, il sera nécessaire d'imposer une pression suffisamment haute pour que le mélange soit bien homogène et monophasique. Dans le cas du système  $\text{CO}_2$ +EtOH par exemple, cette pression est de l'ordre de 8 MPa à 40 °C.

La richesse du mélange extractant en cosolvant va impacter la solubilité et c'est cette propriété qui est largement exploitée dans l'extraction. A titre d'exemple, la Figure 18 illustre la solubilité de deux polyphénols, la quercétine et l'épicatéchine en fonction de la pression et du pourcentage d'éthanol. Pour une composition  $\text{CO}_2$ -solvant donnée, la solubilité est une fonction croissante de la pression, et pour une pression donnée, la solubilité croît avec le pourcentage de cosolvant dans le mélange. Plus la pression est élevée, plus l'effet du cosolvant est marqué. Nous constatons d'après la Figure 18 que les deux polyphénols ont des solubilités du même ordre de grandeur, quelles que soient les conditions. Autrement dit, si la pression et la teneur en cosolvant permettent bien d'améliorer leur solubilité et par conséquent leur extractibilité, ces paramètres ne permettront pas leur fractionnement/séparation. Si le choix du cosolvant est dicté par les interactions qu'il doit générer avec une molécule, d'autres considérations process peuvent générer d'autres contraintes : la toxicité, les précautions de manipulation (inflammabilité, réactivité à l'air) et la facilité de séparation  $\text{CO}_2$ -solvant. Pour des applications agro-alimentaires, l'aspect législatif n'est pas à négliger. L'éthanol est ainsi le cosolvant de choix dans l'extraction de métabolites végétaux par fluides supercritiques en raison de sa faible toxicité.



**Figure 18 :** Solubilisation de deux polyphénols dans un mélange  $\text{CO}_2$ +Ethanol ; à gauche, solubilité ( $10^3 y_2$ ) de la quercétine (Chafer 2004) ; à droite, solubilité ( $10^4 y_2$ ) de l'épicatéchine (Chafer 2002). Solubilités croissantes avec le pourcentage d'EtOH de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 %.

Ces contraintes peuvent être levées en conduisant l'extraction en l'absence de cosolvant, soit en  $\text{CO}_2$  pur. L'efficacité de l'extraction sera alors très dépendante du couple pression/température en fonction de la solubilité avec ces paramètres. La solubilité est une fonction croissante de la pression quelle que soit la température. L'effet de la température est plus complexe et dépend de la zone de pression : à pressions modérées, la solubilité diminue quand la température augmente, alors qu'aux pressions plus élevées, la solubilité croît avec la température. Ce comportement reflète l'effet antagoniste de la température sur la densité du milieu et la volatilité du soluté.

Les variations de solubilité en fonction de la pression et de la température et/ou au type et teneur de cosolvant permettent de réaliser du fractionnement. Sur des coproduits de cerise, Serra *et al.* (2010b) ont, par exemple, d'abord appliqué un traitement au  $\text{CO}_2$  pur qui extrait les molécules lipophiles et apolaires. Une seconde étape utilisant un mélange  $\text{CO}_2$ +éthanol a permis d'extraire les molécules plus polaires. Plus le mélange est riche en éthanol, plus les extraits sont riches en polyphénols, alors que la fraction obtenue en  $\text{CO}_2$  pur n'en contient pas. Les anthocyanes sont extraits lorsque l'EtOH est présent à plus de 20 % dans le fluide.

### II.3.2. Avantages, inconvénients & aspect économique du $\text{CO}_2$ supercritique

Le  $\text{CO}_2$  supercritique est un solvant GRAS (Generally Recognized As Safe), non toxique et ininflammable. Il est écologiquement propre, puisque les procédés à l'échelle industrielle fonctionnent en boucle fermée et ne relâchent donc pas de  $\text{CO}_2$  dans l'atmosphère.

Comme évoqué précédemment, le  $\text{CO}_2$  présente un certain nombre d'avantages (Source : *Les études de France Agrimer 2012*) :



- Diffusivité élevée, faible viscosité et faible tension de surface,
- Procédé flexible dans lequel il est possible de contrôler le pouvoir solvant et donc la sélectivité du fluide supercritique en modifiant les conditions de température et de pression,
- Extraction généralement rapide,
- Température critique relativement basse (31 °C), qui permet d'éviter la thermodestruction éventuelle des composés, de minimiser les risques d'hydrolyse et d'isomérisation des produits,
- Séparation aisée du CO<sub>2</sub> et de l'extrait ne nécessitant pas de purification postérieure,
- Source de CO<sub>2</sub> facilement disponible. Il est produit en grande quantité comme coproduit de la fermentation, combustion et est présent dans l'atmosphère.

Les inconvénients majeurs de l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique concernent surtout l'aspect économique, car ces procédés sont plus coûteux en investissement que les procédés d'extraction traditionnels. Cette technologie exige une consommation d'énergie non négligeable pour établir les pressions et les températures des différentes étapes d'extraction (extraction, séparation et recyclage du solvant). Plusieurs auteurs ont chiffré le coût de production de différents extraits ou huiles obtenus par FSC, en s'appuyant sur le logiciel de simulation SuperPro Designer<sup>®</sup> (Farias-Campomanes 2013, Rosa 2005, Veggi 2014). Le calcul du coût repose sur la relation suivante:

$$\text{COM} = 0,304 \text{ FCI} + 2,73 \text{ COL} + 1,23 (\text{CUT} + \text{CWT} + \text{CRM})$$

Le coût de production (COM) tient compte de toutes les dépenses liées à la mise en œuvre d'une extraction (CUT), l'investissement du matériel (FCI), la main d'œuvre (COL), le prix de transformation de la matière première (CWT) et son coût brut (CRM). Toutes ces dépenses sont mises en parallèle de la rentabilité, la capacité et l'amortissement de l'équipement sur plusieurs années. Le coût de production (COM) est dépendant de la capacité de l'extracteur, plus celle-ci sera grande moins le coût sera important.

Farias-Campomanes *et al.* (2013) ont ainsi évalué un coût se situant entre 128 et 192 € par kg d'extrait de polyphénols, extrait obtenu à partir de coproduits de raisins, pour respectivement 100 min et 180 min d'extraction et un dispositif de 0,05 et 0,5 m<sup>3</sup> en capacité. D'autre part, la production d'extrait de romarin par FSC s'élève de 44 à 390 €/kg pour des rendements respectifs de 1,8 % à 3,50 % et des unités d'extraction de 5 litres et 1 000 litres. Dans le commerce, l'huile de romarin est vendue entre 54 et 179 €/kg en fonction de la méthode d'extraction (Zibetti 2013). La viabilité économique semble possible, par exemple, pour de l'huile de pépins de raisins qui a un coût de production d'environ 6 €/kg et qui est vendue de 2 à 6 fois plus chère en fonction de la qualité (de 10 €/kg à 30 €/kg d'huile de pépins de raisins) (Fiori 2010, Prado 2012).



### II.3.3. Exemples d'extraction par fluides supercritiques

Depuis ces 15 dernières années, plus de 300 végétaux ont été traités par technologie supercritique, afin d'extraire divers métabolites comme les lipides, les huiles essentielles, les arômes, les pectines et les polyphénols (Diaz Reinoso 2006, Romo-Hualde 2012, Stefani 1997, Herrero 2006, Wang 2014, Fiori 2009, Marostica 2010). La plupart de ces extraits ont été proposés pour des applications en nutrition humaine et santé ou en agroalimentaire (Melo 2014b, Zabot 2013). Pour ce qui relève des mots clés "polyphénols" et "extraction supercritique", plus de 70 articles ont été publiés depuis 2006 (*source : scopus*). Une revue de la littérature a été publiée par Marostica en 2010, qui a également discuté de l'influence des différentes opératoires, faisant écho à l'analyse plus complète publiée par Reverchon en 2006. Quelques exemples sont donnés Tableau 9. En rapport avec les coproduits agroalimentaires, les résidus de la filière "vin" sont les plus fréquemment étudiés : pelures et pépins (Fiori 2009, Marqués 2013), bagasse (Farias-Campomanes 2013) ou marc de raisin (Da Porto 2014a, 2014b, Oliveira 2013, Pinelo 2007). D'autres coproduits ont été testés : pulpes de cerises (Serra 2010b), prunes de jamun (Maran 2014), feuilles de pitanga (Garmus 2014), feuilles d'*arrabidaea chica* (Paula 2014), extraction des anthocyanines colorées à partir de pelures d'aubergine (Chatterjee 2013), de composés phénoliques de gâteaux de presse de diverses baies (Laroze 2010), d'huile contenant des phénols à partir de noyaux de cerise (Yilmaz 2013) ou de pépins de raisin (Rombaut 2014). Malgré l'abondance des articles, une seule étude a été réalisée sur un coproduit de pommes, en l'occurrence un gâteau de presse (Hasbey Adil 2007). Réalisée sur 1 g de charge, l'article explore l'influence de la pression (20-60 MPa), de la température (40-60 °C), du pourcentage d'éthanol (14-20 %) et de la durée (10-40 min) sur l'extraction des polyphénols totaux et l'activité antioxydante des extraits. Néanmoins, aucun polyphénol individuel n'est identifié ni quantifié.

Tableau 9 : Exemples de paramètres d'EFS de matrices végétales (Selon Marostica 2010.)

Echantillon		Température (°C)	Pression (Mpa)	Temps (min)	Cosolvant (%)	Molécule d'intérêt	Référence article (Selon Marostica 2010)	
Buplèvres	Racine	40	0,5 à 20			Polyphénols et Antioxydants	35	Wang 2005
Raisin et sureau	Marc	40	15-35		éthanol		8	Vatai 2009
Gingembre et romarin		30;4	30, 25				54	Moraes 2008
Goyave	Pépin	40-50-60	10-20-30	120	10% éthyl acétate, éthanol		57	Castro 2009
Pistache	Coque	35-45-55	10-20-35	15-25-40	0,5 et 15% méthanol		30	Goli 2004
Raisin	Marc	45	10-15-25		5% méthanol		33	Louli 2004
Romarin	Feuille	100	40		5% méthanol		31	Celiktas 2007
Thé vert	Feuille	60	31		15 à 100% éthanol	Catéchine et Polyphénols	58	Chang 2000
Menthe verte	Feuille	40-50-60	10-20-30	30-60-90	éthanol	Flavonoides	19	Bimakr 2009
Camomille	Fleur	40-45	20,3	30	15% méthanol		22	Scalia 1999
Raisin	Marc	35-50	0-8-35	60	0 à 8% éthanol	Polyphénols	13	Pinelo 2007
Raisin	Pépin	40	20,3	180	2 à 15% méthanol, éthanol		27	Murga 2000
Olive	Feuille	80-100-120	15-33	4-15	0 à 20% éthanol, méthanol		20	Le Floch 1998
Romarin	Feuille		10	60			3	Ramirez 2005
Cacao	Coque	50	10-20		méthanol, acétone	Antioxydants	24	Arlorio 2005
Lamiacées	Herbe	100	35				59	Babovic 2009
Mangoustan	Fruit	40	20		4% éthanol		60	Zarena 2009
Origan	Feuille	41	15-25-35	50	0,4 et 7% éthanol		26	Cavero 2006
Basilic		31	10 à 30	15-30-45-60	1-10-20% eau		21	Leal 2008

Généralement, une augmentation de la température accélère le transfert de masse entre la plante et le solvant, augmentant le rendement d'extraction (Miao 2010). Le taux de flavonoïdes augmente de 12,76 mg/g à 15,52 mg/g pour des températures d'extraction respectives de 30 °C et 50 °C (Shan 2012). Pour Murga *et al.* (2000), seul l'acide chlorogénique est affecté par une augmentation de la température. Il serait soumis à l'oxydation, l'hydrolyse et l'isomérisation qui sont les plus grandes voies de dégradation des polyphénols. Des températures de plus de 23 °C provoqueraient une hydrolyse de l'acide chlorogénique en acide quinique.

La taille des particules de l'échantillon contrôle également les cinétiques de transfert de masse et l'accès aux CO<sub>2</sub> des composés solubles. Une meilleure extraction est rapportée par Nagy *et al.* (2008) à partir de petites particules, alors que le paramètre est sans incidence sur l'extraction des dihydrochalcones (Murga 2000). L'hypothèse semble être que la phloridzine et ses dérivés sont les composés les plus facilement accessibles car les moins liés aux épidermes de pommes.

La nature du cosolvant modifie l'extraction des polyphénols, par action directe sur la solubilité comme nous l'avons vu précédemment. Murga *et al.* (2010) observent que la solubilité augmente avec le taux de cosolvant notamment pour l'acide gallique, la catéchine et l'épicatéchine. La

présence d'éthanol augmente l'extraction des polyphénols du marc de raisin (Brazinha 2014). A partir de cerises, le rendement en polyphénols augmente de 5 % avec l'extraction par CO<sub>2</sub> à 16 % avec l'éthanol en cosolvant et 22 % avec l'eau (Garmus 2014). L'eau modifie l'extraction des flavonoïdes du fruit de la margose et son activité antioxydante (Shan 2012) avec un optimal à 46 °C et 33 MPa. Markom (2007) montre que l'eau et l'éthanol sont les deux solvants les plus intéressants pour l'extraction des tannins et des polyphénols et précise que l'eau est préférable pour l'extraction des acides phénoliques alors que l'éthanol (30 %) est préférable pour extraire la corilagine. L'utilisation de cosolvant augmente le rendement et la capacité antioxydante des extraits de feuilles de pêcher (Kazan 2014) ou des cerises (Serra 2010).

Un autre effet intéressant du CO<sub>2</sub> dans le cas de l'extraction de matrices susceptibles de se dégrader, est l'inactivation des enzymes alimentaires (Xu 2011, Gui 2007, Wimmer 2010). Les traitements thermiques peuvent stabiliser les produits mais ils causent une dégradation des composés thermosensibles. De ce fait, des techniques alternatives au CO<sub>2</sub> ont été développées en agroalimentaire dès 1992 sur diverses matrices (Chen 1992), de la solution modèle de PPO (Manzocco 2014) aux extraits de végétaux (Liu 2010, Fabroni 2010). Un traitement au CO<sub>2</sub> sous 30 MPa et 55 °C pendant 60 min inactive 60 % de la PPO de jus de pommes (Gui 2007, Xu 2011). Selon Chakraborty *et al.* (2014), le mécanisme d'inactivation de l'enzyme sous CO<sub>2</sub> à haute pression est similaire à celui de la dénaturation d'une protéine, à savoir un changement de conformation de la structure de l'enzyme et notamment de son site actif.

Il est important de souligner que ces études se focalisent sur l'inactivation des enzymes en solution mais il ne semble pas y avoir d'étude sur l'inactivation de la PPO dans des matrices solides.

### III. Utilisation des matériaux de plantes dans les émulsions

#### III.1. Généralités sur les émulsions

Les émulsions sont des mélanges métastables de deux liquides non miscibles tels que l'huile et l'eau, d'aspect macroscopiquement homogène. Elles résultent de la dispersion sous forme de gouttes sphériques, de diamètre variant de 0,1  $\mu\text{m}$  à quelques dizaines de micromètres, de l'un des liquides (appelé phase dispersée) dans le second (appelé phase continue). Sur le plan fondamental, les émulsions soulèvent des questions relatives à leur préparation (émulsification), leur durée de vie (mécanismes et cinétique de destruction) et leurs propriétés d'écoulement (rhéologie, élasticité des émulsions concentrées). Les émulsions offrent de réels avantages technologiques : elles permettent par exemple de mélanger des espèces insolubles pour réaliser des associations de goûts (alimentaire), de transporter des substances organiques dans des solvants non nocifs (bâtiment), de faciliter l'écoulement de substances intrinsèquement très visqueuses (génie pétrolier et travaux publics) ou de donner à un produit une texture originale (cosmétique). En conséquence, de nombreux produits industriels ou d'usage courant sont des émulsions, comme le beurre, la mayonnaise, les sauces, les crèmes et les laits pour la peau, les revêtements routiers ou les peintures.

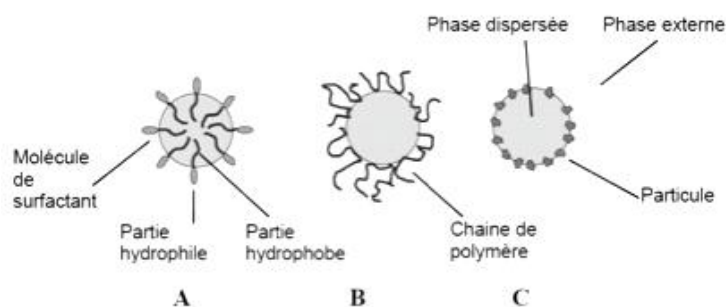
Le contact entre deux phases non miscibles génère une énergie de surface appelée "tension de surface" généralement notée  $\gamma$  (exprimée en  $\text{J/m}^2$ ) qui rend les émulsions thermodynamiquement instables. L'émulsification augmente considérablement la surface de contact entre les deux phases et le système évolue au cours du temps de façon à revenir à l'état démixé initial où la surface de contact est minimale. La destruction des émulsions s'effectue via deux mécanismes limites (Leal-Calderon 2007):

- la coalescence qui consiste en la formation spontanée d'un canal entre deux gouttes d'émulsion au contact suivie d'une relaxation de forme menant à une goutte unique de plus faible surface,
- le mûrissement d'Ostwald qui consiste en un transfert de matière des gouttes de plus faible diamètre vers celles de plus grand diamètre par diffusion moléculaire à travers la phase continue. Le mûrissement d'Ostwald se produit lorsque la phase dispersée possède une légère solubilité dans la phase continue.

Bien que les mécanismes microscopiques soient très différents, les deux types d'instabilités tendent à réduire le nombre de gouttes dans l'émulsion et à augmenter leur diamètre moyen.

Il est possible de maintenir durablement l'état émulsionné (de plusieurs heures à plusieurs années) grâce à l'utilisation d'agents stabilisants, appelés émulsifiants ou tensioactifs. Il est important de noter que cette stabilité n'est que d'ordre cinétique, le retour vers l'état démixé restant inéluctable. Les émulsions ainsi obtenues sont des matériaux dits "métastables", c'est à

dire capables d'exister durablement dans un état qui n'est pas le plus stable. Les émulsifiants sont des molécules amphiphiles, dotées d'une double affinité pour l'eau et pour l'huile grâce à la présence dans leur structure chimique de segments hydrophiles et hydrophobes. Cette propriété permet aux émulsifiants de s'adsorber à l'interface entre l'huile et l'eau, facilitant ainsi la fabrication des émulsions par abaissement de la tension interfaciale et prolongeant leur temps de vie. Les émulsifiants les plus utilisés dans la formulation sont des tensioactifs monomériques, des macromolécules et des particules solides (Figure 19).



*Figure 19: Mécanismes de stabilisation des émulsions : A/ par des tensioactifs monomériques ; B/ par des chaînes polymériques ; C/ par des particules solides (Myers 2006).*

Les tensioactifs monomériques sont des molécules de faible masse molaire, généralement inférieure à  $1\,000\text{ g.mol}^{-1}$ . Leur structure chimique comprend un groupement polaire et une ou deux chaînes hydrocarbonées comportant entre 6 et 20 motifs méthyles. Les acides gras, les mono et diglycérides, les phospholipides sont des exemples d'émulsifiants naturels monomériques utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Dans ce cas, la stabilisation des émulsions résulte de la présence de barrières stériques et/ou électrostatiques entre les surfaces. Il existe quatre types d'émulsifiants monomériques, classés selon la nature de la partie hydrophile :

- Les tensioactifs anioniques : la partie hydrophile est chargée négativement.
- Les tensioactifs cationiques : la partie hydrophile est chargée positivement.
- Les tensioactifs zwitterioniques ou amphotères : la partie hydrophile comporte une charge positive et une charge négative, la charge globale étant nulle.
- Les tensioactifs non ioniques : la molécule ne comporte aucune charge nette.

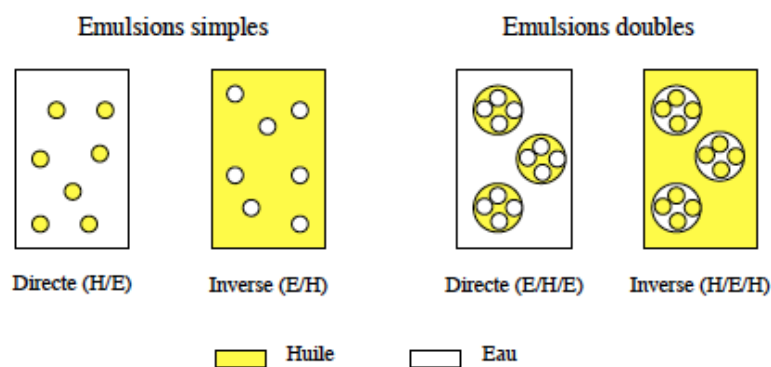
Parmi les stabilisants macromoléculaires d'émulsions, on distingue des substances naturelles (protéines, amidons, gommages) et synthétiques (alcool polyvinylique, acide polyacrylique, polyvinylpyrrolidone). Ces macromolécules retardent la coalescence des gouttelettes en générant une barrière mécanique ("stérique") entre les surfaces.

Il existe plusieurs types d'émulsions. Les émulsions simples peuvent être de type huile-dans-eau (H/E) ou eau-dans-huile (E/H) (Figure 20). Le type d'émulsion est principalement dicté

par la solubilité de l'émulsifiant. L'agent émulsifiant peut être préférentiellement soluble dans la phase aqueuse ou dans l'huile. Lorsqu'un mélange ternaire d'eau, d'huile et d'émulsifiant est soumis à une agitation mécanique, l'émulsion qui se forme préférentiellement est celle dont la phase continue solubilise le tensioactif. Si le tensioactif est soluble dans l'eau (respectivement huile), l'émulsion que se formera préférentiellement sera de type H/E (respectivement E/H). Cette règle empirique qui relie la solubilité de l'agent émulsifiant et le type d'émulsion est connue sous le nom de règle de Bancroft.

Il est possible de fabriquer des systèmes plus complexes. Des émulsions multiples (doubles) contiennent dans la phase dispersée une deuxième phase dispersée. Ainsi, les émulsions multiples de type eau-dans-huile-dans-eau (E/H/E) sont des systèmes dans lesquels des globules d'huile sont dispersés dans une phase aqueuse, les globules contenant eux mêmes de fines gouttes de phase aqueuse. De la même façon, il existe des émulsions de type huile-dans-eau-dans-huile (H/E/H) (Figure 20). Ces systèmes mettent en œuvre deux processus d'émulsification successifs et associent deux types d'émulsifiants : l'un hydrosoluble et l'autre liposoluble.

Les émulsions multiples permettent d'encapsuler des substances afin d'obtenir une libération contrôlée de celle-ci (Tedajo 2005). Dans le cas des émulsions de type E/H/E, un principe actif peut être dissous dans la phase aqueuse. La phase huile constitue alors une barrière à la diffusion du principe actif (Ferreira 1995 a/b, Pays 2002).



*Figure 20: Différents types d'émulsion.*

### III.2. Emulsions de Pickering

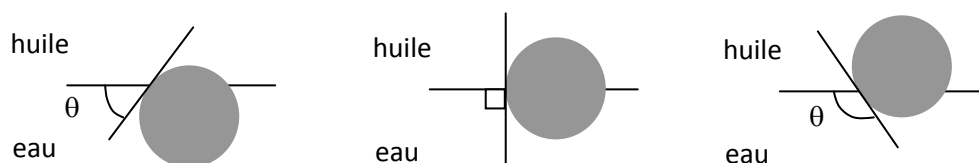
Il y a plus d'un siècle, Ramsden (1903) et Pickering (1907) ont démontré l'aptitude de particules colloïdales à stabiliser durablement des émulsions. Grâce à la microscopie optique, Pickering observe l'adsorption des particules et relève le caractère "rigide" des interfaces. Cette étude pionnière est à l'origine de la terminologie actuellement utilisée pour désigner ces matériaux : les émulsions de Pickering. Depuis une quinzaine d'années, sous l'impulsion de

plusieurs équipes, ces systèmes ont connu un regain d'intérêt, d'autant plus marqué que l'amélioration des procédés de synthèse et de fonctionnalisation permet aujourd'hui de produire des particules dont la nature, la forme, la taille et la mouillabilité sont extrêmement variées.

La stabilisation est possible lorsque les particules possèdent des propriétés amphiphiles et de ce fait s'adsorbent aux interfaces. Lorsque la surface d'une particule colloïdale est très hydrophile comme c'est le cas des oxydes, une fonctionnalisation chimique de la surface est possible par greffage chimique de segments hydrophobes ou par adsorption de tensioactifs.

### III.2.1. Angle de contact & énergie d'ancrage

L'adsorption de particules sphériques amphiphiles est caractérisée par l'angle de contact  $\theta$  défini sur la Figure 21. Pour des particules préférentiellement hydrophiles, l'angle de contact  $\theta$  est inférieur à  $90^\circ$  et la particule est majoritairement mouillée par la phase aqueuse. En revanche, pour des particules préférentiellement hydrophobes, l'angle de contact  $\theta$  est supérieur à  $90^\circ$  et la majeure partie de la particule sera au contact de la phase huileuse.



*Figure 21. Configuration d'une particule sphérique adsorbée sur une interface eau/huile plane pour un angle de contact  $\theta$  inférieur à  $90^\circ$  (à gauche), égal à  $90^\circ$  (au centre) et supérieur à  $90^\circ$  (à droite).*

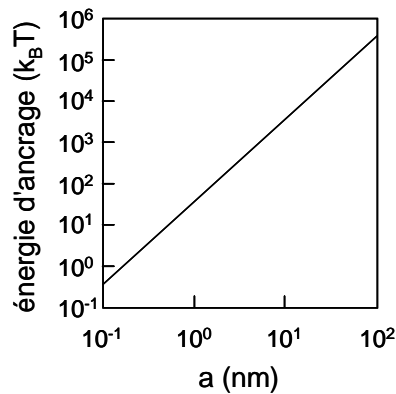
Les particules colloïdales sont souvent irréversiblement adsorbées à l'interface eau/huile. Pour une particule sphérique de rayon  $a$ , adsorbée à l'interface huile/eau, l'énergie d'ancrage est donnée par la relation suivante :

$$E_a = \gamma_{EH} \pi a^2 (1 - \cos \theta)^2$$

où  $\gamma_{EH}$  est la tension interfaciale entre l'huile et l'eau.  $E_a$  représente l'énergie à fournir pour désorber la particule de l'interface. Nous remarquons que cette énergie est toujours positive et varie comme le carré du rayon de la particule.

La Figure 22 représente l'évolution de  $E_a$  en fonction du rayon  $a$ . Les paramètres choisis pour la figure sont :  $\gamma_{HE} = 50 \times 10^{-3} \text{ J.m}^{-2}$  et  $\theta = 90^\circ$ . Il apparaît que pour  $a = 10 \text{ nm}$ , il faut mettre en jeu

$1000 k_B T$  où  $k_B$  est la constante de Maxwell-Boltzmann et  $T$  la température absolue. Dans ce cas, l'adsorption des particules est irréversible car l'énergie d'ancrage est très supérieure à l'énergie thermique  $k_B T$ . Ceci constitue une différence majeure avec les molécules de tensioactifs, qui s'adsorbent ou se désorbent réversiblement. Cette différence est à l'origine des propriétés originales des émulsions de Pickering (Destribats 2010).



*Figure 22. Evolution de l'énergie nécessaire pour désorber une particule sphérique de rayon  $a$  adsorbée à une interface plane eau/huile ( $\gamma_{HE}=50 \text{ mN.m}^{-1}$ ) avec un angle de contact de  $90^\circ$  ( $T=298^\circ\text{K}$ ).*

### III.2.2. Règle empirique de Finkle

En présence de tensioactifs, la loi empirique de Bancroft permet de prévoir le type d'émulsion en fonction de la solubilité préférentielle du tensioactif utilisé. Dans le cas des émulsions stabilisées par des particules colloïdales, Finkle *et al.* furent les premiers en 1923, à essayer d'établir une relation entre la nature des particules colloïdales et le type d'émulsion obtenu (Finkle 1923). Ils ont conclu que dans une émulsion de Pickering, la phase qui mouille préférentiellement les particules solides sera la phase continue. De cette observation est née la loi empirique dite de Finkle (équivalente à la règle de Bancroft qui s'applique aux tensioactifs). Celle-ci a ensuite été consolidée à partir de la notion d'angle de contact. Schulman et Leja (Schulman 1954) ont en effet montré que pour  $\theta < 90^\circ$ , les particules stabilisent les émulsions H/E tandis que pour  $\theta > 90^\circ$ , l'émulsion obtenue est E/H. Récemment, Binks *et al.* ont approfondi et généralisé ces résultats (Binks 2000 a/b/c/d ; Ashby 2000, Binks 2001, Binks 2002). Pour cela, ils utilisent des particules de silice de diamètre compris entre 10 nm et 30 nm, traitées en phase gazeuse par du dichlorodiméthylsilane (Binks 2000b). Afin de quantifier l'hydrophobicité des particules, le pourcentage de silanol (SiOH) en surface des particules est mesuré. Il varie de 100% pour la silice non traitée à 14 % pour la silice la plus hydrophobe. Les auteurs montrent qu'en

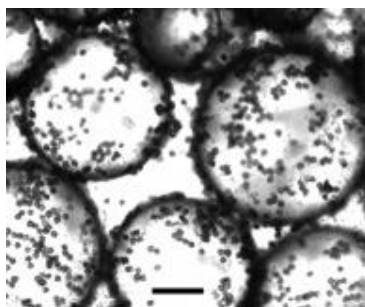


présence de volumes d'eau et d'huile égaux, l'émulsion formée est de type H/E si les particules sont plutôt hydrophiles, et de type E/H si les particules sont plutôt hydrophobes.

### III.2.3. Structure des interfaces

Dans les émulsions de Pickering, les particules sont adsorbées par agitation mécanique. L'état d'agrégation des particules dans le volume avant adsorption, ainsi que l'intensité de l'agitation influencent l'état final de la couche adsorbée. Ainsi, lorsque les particules sont floculées dans le volume et que l'agitation est faible, il est très fréquent que l'adsorption s'effectue à l'échelle des agrégats et non à l'échelle des particules individuelles (Arditty 2003). Seules quelques particules sont ancrées à l'interface, le reste du cluster étant immergé dans la phase continue. Ce cas de figure est analogue à celui d'un polymère dont l'adsorption se fait *via* quelques segments. Les études sur la conformation des particules aux interfaces huile-eau dans les émulsions de Pickering ont révélé une grande variété de structures : cristal répulsif peu dense (Horozov 2006), empilement hexagonal compact de sphères au contact (Arditty 2005), amas fractals (désordonnés) à deux dimensions (Gautier 2007), ancrage d'amas fractals à 3 dimensions (Arditty 2003). Dans le cas où les particules constituent un empilement hexagonal compact de sphères au contact, il a été montré que les couches interfaciales ont un caractère « solide » très marqué en raison de la très forte attraction latérale entre les particules adsorbées (Arditty 2005). Les émulsions qui en résultent ont des stabilités hors du commun et peuvent par exemple résister à l'élimination de la phase continue par évaporation sans se déstabiliser (Arditty 2004).

Une situation singulière a été décrite par Vignati *et al.* (2003). Ces auteurs ont montré qu'il était possible de stabiliser des émulsions de type huile dans eau alors que la fraction de surface recouverte par les particules est de l'ordre de seulement 5 %. Etonnés d'observer ce taux de couverture aussi bas, les auteurs ont émis l'hypothèse d'un réarrangement des particules aux interfaces. Ils ont ainsi montré que les particules de silice adsorbées sur les gouttes d'émulsions sont soumises aux mouvements browniens, leur coefficient de diffusion étant d'autant plus faible que la concentration surfacique en particules est importante. Le mouvement brownien explique la capacité des particules à se mouvoir vers la zone de contact entre deux gouttes. A partir d'observations au microscope optique, ils mettent en évidence une localisation préférentielle des particules au niveau des zones de contact entre les gouttes et une ré-homogénéisation de celles-ci lorsque le contact est rompu. L'origine de cette localisation préférentielle reste inexpliquée. La stabilisation à des très faibles taux de couverture a également été rapportée dans d'autres systèmes incluant des émulsions stabilisées par des spores de *Lycopodium clavatum* (Binks 2005) (Figure 23).



*Figure 23. Cliché de microscopie optique d'une émulsion de myristate d'isopropyle stabilisée par des spores de *Lycopodium clavatum*, barre d'échelle = 200  $\mu$ m (Binks 2005).*

#### III.2.4. Emulsions de Pickering obtenues à partir de particules d'origine biologique

Les émulsions de Pickering présentent des atouts susceptibles de les rendre attractives pour des applications technologiques :

- la grande diversité des particules colloïdales accessibles (silices, oxydes métalliques, latex, ...),
- les nombreuses possibilités de fonctionnalisation des particules pour rendre leur surface amphiphile, par voie chimique, par adsorption de tensioactifs à faible concentration,
- la facilité de mise en œuvre du processus d'émulsification,
- une stabilité cinétique hors du commun dans certains cas,
- des propriétés rhéologiques originales.

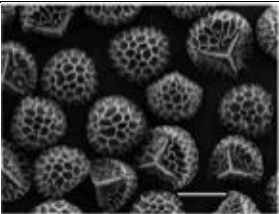
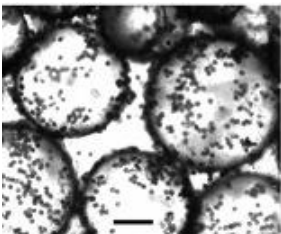
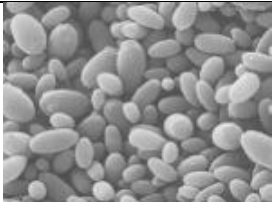
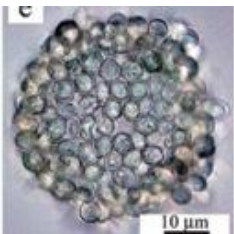
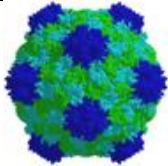
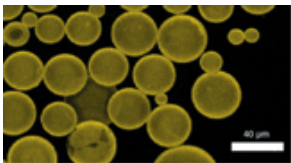
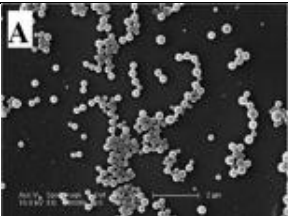
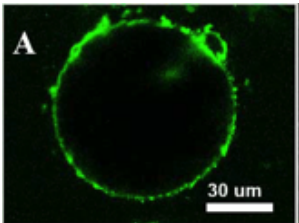
Au cours des 10 dernières années, l'activité de recherche sur les émulsions de Pickering s'est considérablement intensifiée en direction des particules amphiphiles d'origine naturelle pour des applications visées dans l'agroalimentaire, la cosmétique, la pharmacie et les biotechnologies (Lam 2014). Cette démarche s'inscrit dans une volonté de substituer des molécules tensioactives pétrosourcées par des espèces amphiphiles naturelles offrant de nouvelles potentialités en termes de stabilisation, de propriétés rhéologiques ou sensorielles. Néanmoins, l'utilisation de particules biosourcées par opposition aux particules de silice ou de latex complique le problème par le fait que ces particules ne sont pas idéalement sphériques, dures ou régulières en surface, ce qui va impacter leur capacité émulsifiante, leur adsorption à l'interface eau/huile et la stabilité des émulsions (Rayner 2014).

Ainsi, des publications font état de la stabilisation d'émulsions par des particules telles que :

- des spores (Binks 2005),
- des bactéries (Dorobantu 2004),
- le virus de la mosaïque du niébé CPMV (Russell 2005),
- des levures (Brandy 2010),
- des nanocristaux de cellulose (Kalashnikova 2011),

- des cristaux de chitine (Tzoumaki 2011),
- des granules d'amidon bruts ou modifiés (Tan 2012, Yussoff 2011).

Des photos illustrant la nature des particules et les émulsions obtenues sont données Figure 24.

Particule	Emulsion	Référence
 <p>Spores</p>		Binks 2005
 <p>Levures</p>		Brandy 2010
 <p>Virus</p>		Russell 2005
 <p>Amidon</p>		Tan 2012

*Figure 24 : Exemples d'émulsions de Pickering stabilisées par des particules d'origine naturelle.*

Certaines de ces particules comme le CPMV peuvent s'auto assembler aux interfaces pour constituer des couches d'une grande rigidité (Russell 2005). Dans d'autres cas, la rigidité peut résulter de la formation par la voie biochimique de liens covalents entre les particules adsorbées. Quelle que soit la méthode d'assemblage aux interfaces, l'intégrité des virus ou des bactéries est préservée.

Plus proche de notre matériau, Turan *et al.* ont étudié l'impact de la farine de noisettes (brutes ou grillées et délipidées) ajoutée à 0,5 %, 1 % et 2 % à la phase aqueuse, sur la stabilisation d'émulsions de divers ratio eau/huile (Turan 2015). Si le traitement thermique des noisettes n'induit pas de différence significative sur la taille des gouttelettes d'huile de l'émulsion, il conduit à une meilleure stabilisation des émulsions contre l'agrégation.

Cette démarche est prometteuse car elle permet d'envisager le couplage des propriétés d'usage des émulsions (transport) et de la fonctionnalité des espèces biologiques (par exemple les probiotiques).

#### **IV. Conclusion de l'étude bibliographique**

Le bénéfique bien-être/santé lié à la consommation de pommes, s'il est largement relayé dans les medias, s'appuie sur une réalité bien documentée au niveau de la littérature. Comme nous l'avons montré dans cette étude bibliographique, une partie de l'aspect nutritionnel provient de la présence de polyphénols, classe qui regroupe environ 8 000 composés. Les représentants des sous groupes sont diversement présents dans les fruits, dans les variétés d'un même fruit et dans les différents tissus qui composent ce fruit, sans parler des conditions même de la culture. Pour la pomme, ce sont les épidermes qui sont particulièrement riches en polyphénols, cela a orienté le choix de notre matière première d'étude et nous serons confrontés à la variabilité en polyphénols de différents lots de pommes. Les conditions de stockage, de déshydratation et des opérations de transformations de la pomme (préparation de jus, de compotes) dont ils constituent un "coproduit" sont susceptibles d'impacter la teneur totale en polyphénols et la capacité antioxydante avec néanmoins une sensibilité variable selon la famille ou le composé individuel considéré. L'évolution peut trouver sa source dans la dégradation enzymatique des polyphénols, favorisée par toutes conditions mettant en contact l'enzyme, les polyphénols et l'oxygène. Des solutions d'inactivation existent et parmi elles nous nous intéresserons plus particulièrement au blanchiment thermique et à l'ajout de coproduits de fruits comme agents naturels antibrunissement.

Trouver des débouchés aux "coproduits" de la production agricole et agroalimentaire est un objectif qui concerne de plus en plus les acteurs de la filière, car même les éliminer via l'épandage ou vers l'alimentation animale a un coût. Dans cette optique, utiliser ces coproduits comme sources de molécules d'intérêt et chercher à les extraire est une voie de valorisation de plus en plus explorée. L'extraction des polyphénols à partir de diverses matrices est plutôt bien documentée même s'il n'existe pas de méthode unique ni standardisée en raison de la diversité des composés phénoliques et de la spécificité inhérente à chaque matrice. Les résultats de la littérature fournissent une base sur laquelle s'appuyer pour interpréter nos propres résultats. La littérature sur l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique à partir de végétaux est très riche mais l'intérêt pour les molécules phénoliques est plus récent. La faible solubilité des polyphénols dans le CO<sub>2</sub> pur conduit à utiliser d'un cosolvant polaire le plus souvent le méthanol ou l'éthanol, dans des proportions généralement inférieures à 15 %. Les conditions de pressions et de températures explorées sont typiquement inférieures à 35 MPa et 60 °C. L'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique + cosolvant de polyphénols à partir de pommes n'a fait l'objet que d'une seule publication (Hasbey Adil 2007). Dans cette étude, réalisée sur une très faible quantité de matière (1 g de gâteau de presse), les extraits ont été caractérisés en termes de polyphénols totaux et d'activité antioxydante, mais sans les identifier ni les quantifier individuellement. Notre étude, portant sur une charge plus

importante (dizaines de grammes) et s'attachant à établir les profils d'extraction de 9 polyphénols, constitue donc une originalité. Par ailleurs, dans la littérature "supercritique", aucune mention n'est faite des dérivés hétérosides de quercétine. S'intéresser à l'extraction de ces composés, abondants dans la pomme et qui contribuent à l'activité antioxydante est donc une seconde originalité.

L'utilisation de coproduits solides pour stabiliser une émulsion constitue une autre originalité du travail qui s'inscrit dans les nouvelles tendances de stabilisation des émulsions par des produits biosourcés (bactéries, spores, nanocristaux de cellulose, granules d'amidon). Si les mécanismes de stabilisation sont bien connus pour des particules sphériques, homogènes en taille et en surface, il est raisonnable de penser que la polydispersion, l'état de surface, la forme irrégulière et la composition physico-chimique de la surface de particules végétales vont considérablement modifier la stabilisation des interfaces eau-huile et à terme la stabilité de l'émulsion.



## ***Chapitre B. Matériels et Méthodes***

---

Le chapitre "Matériel & Méthodes" décrit les techniques utilisées pour la préparation et le traitement des poudres, ainsi que les méthodes de caractérisation des échantillons, essentiellement "l'identification et la quantification" des polyphénols, de la capacité antioxydante et de l'activité biologique des extraits.



## *1<sup>ère</sup> Partie : Préparation des échantillons*

---

## I. Matériel première : de la pomme fraîche à la poudre lyophilisée d'épidermes

### I.1. Pommes *Golden Delicious*

La source végétale choisie est la pomme *Golden Delicious*, un cultivar de pommier domestique. Cette pomme de table, de couleur jaune-vert clair, est la plus produite en France, la plus utilisée dans le secteur agroalimentaire et la plus consommée par la population française. La récolte se fait au début de l'automne.

Au total, 4 lots de pommes ont été nécessaire à ce projet, dont un lot de pommes *Golden* issues de l'agriculture biologique et 3 lots de pommes issues de l'agriculture conventionnelle. En fonction de la période, les matières premières ont été achetées chez des producteurs ou revendeurs lot-et-garonnais. Les fruits ont ensuite été stockés dès réception, dans des caisses plastiques en chambre froide à 1°C, pendant au maximum un an afin d'éviter que les pommes ne flétrissent en se déshydratant.

Les lots à l'origine sont homogènes, la vérification des pommes a été visuelle : même couleur jaune-vert clair, calibre 75/85 (Figure 25). Les lots de pommes ne présentaient pas de défaut apparent, seules les pommes pourries ou très abîmées ont été écartées des lots.

Chaque lot de pomme a été caractérisé physico-chimiquement dès son stockage : le pH (Inolab level 2, Fisherbrand), la couleur (Minolta, Japon), la fermeté (Agrosta 100 Tousch, AgroTechnologie), l'acidité par neutralisation de la soude à 0,1 M et le contenu en sucres totaux (Brix - réfractomètre Atago PAL-3).

Les pommes ont une teneur en eau d'environ 85 %.



*Figure 25: Pomme Golden Delicious.*

### I.2. Lyophilisation

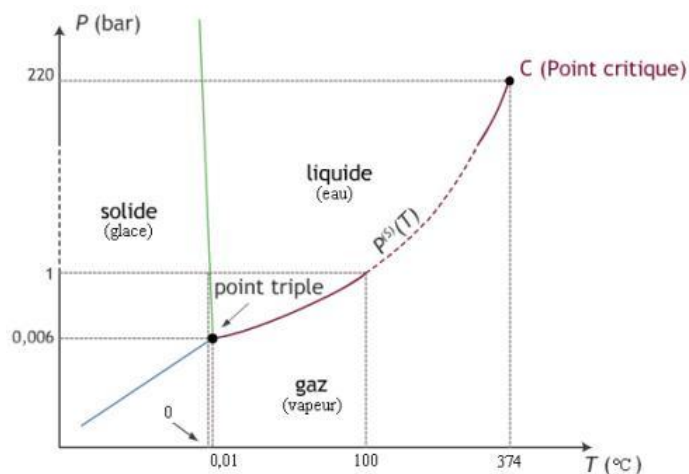


*Figure 26: Peleur de pommes (Kali, France).*

Pour les besoins de l'étude, les pommes ont été pelées avec un peleur mécanique (Kali, France) (Figure 26) à température ambiante (23 °C) puis les épidermes ont directement été congelés à -18 °C dans des sacs sous vide pour les conserver et les stabiliser.

Ensuite, après 24 heures de congélation, les épidermes de pommes sont lyophilisés (Heto Lab Equipment, Heto FD 2,5, Danemark) pendant 48 heures à 23 °C. La lyophilisation consiste à extraire l'eau contenue dans les substances organiques ou minérales par interaction des techniques du vide et du froid. Le produit, préalablement congelé à basse température, est placé dans une enceinte sous vide. L'abaissement de la pression en deçà du point d'équilibre (point triple) sur la courbe de tension de vapeur de l'eau entraîne une sublimation de la glace, c'est-à-dire que l'eau à l'état de glace s'élimine sous forme de vapeur sans passer par l'état liquide (Franks 1998) (Figure 27).

Les épidermes lyophilisés sont broyés (Waring blender - Moulinex, France) pour obtenir une poudre contenant entre 5 et 7 % d'eau. Le contenu en eau a été mesuré par perte de masse en étuve à 69 °C sous vide après 24 heures (Multilab20, le Matériel Physico-Chimique, France). La distribution massique des tailles des particules composant les poudres a été effectuée par tamisage (Retsch AS200 digit, Allemagne). La méthode consiste à superposer verticalement 8 tamis dont le diamètre de passage décroît de haut en bas (1 000, 600, 500, 400, 300, 200, 100 et 50  $\mu\text{m}$ ). Une masse déterminée de poudre est déposée dans le tamis supérieur et le système est soumis à une vibration permanente pendant 10 min. La quantité de poudre collectée par chaque tamis est alors pesée.



*Figure 27: Courbe de tension de vapeur d'eau. P : pression, T : température.*

### I.3. Blanchiment

Le blanchiment est un traitement thermique, appliqué sur le fruit frais pour inactiver les enzymes responsables du brunissement des végétaux. Les échantillons blanchis sont donc des pommes fraîches avec leurs épidermes. Les divers blanchissements ont été effectués avec un four industriel (FRIMA) avec des temps et des températures variant en fonction des essais. Des sondes de températures (TESTO, France) ont été placées dans les échantillons à cœur, et dans l'enceinte du four, en ambiance, pour suivre l'évolution de la température lors du blanchiment.

Les échantillons après blanchiment sont congelées à -18 °C dans des poches sous vide.

### I.4. Réhydratation des poudres lyophilisées

Une des voies de valorisation des épidermes de pommes sous forme sèche est l'utilisation en tant qu'ingrédient végétal pour remplacer les additifs de synthèse dans certains aliments. Les échantillons de pommes lyophilisés ont donc été remis dans un milieu aqueux afin de simuler une réincorporation dans un produit contenant une forte teneur en eau (environ 10 % de poudre de pomme + 90 % d'eau).

Ils ont été incorporés à hauteur de 10 % dans de l'eau milli-Q. Le tout a été homogénéisé avec un Ultra-turrax® pendant 1 min à 9 000 rpm, et laissé dans des béciers à la lumière naturelle et à température ambiante (23 °C). Les échantillons ont été suivis par colorimétrie pendant plusieurs jours (temps variables en fonction des essais) afin de caractériser un éventuel changement de couleur, traduisant un brunissement enzymatique.

La couleur des échantillons est analysée à l'aide d'un colorimètre (MINOLTA CR200, Japon) dans le système CIELab. C'est un modèle de représentation des couleurs de surface adopté en 1976 par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE). Trois grandeurs le caractérisent : la clarté/luminosité  $L^*$  (valeur de 0-noir à 100-blanc) et deux paramètres  $a^*$  et  $b^*$ , qui expriment l'écart de la couleur par rapport à celle de la surface grise (Figure 28). La composante  $a^*$  représente une gamme du rouge (+ 299) au vert (- 300) en passant par le gris (0) et  $b^*$  représente un axe du jaune (+ 299) au bleu (- 300) L'illuminant choisit dans notre étude est celui de la lumière du jour normalisée D65. La moyenne et l'écart type sont calculés sur 10 mesures de couleur ( $n = 10$ ).

Un flash de lumière est émis au niveau de la tête de lecture par une lampe xénon. L'énergie lumineuse réfléchiée par le produit traverse des filtres colorés et est captée par des cellules photoélectriques qui amplifient cette énergie et la quantifient.

Les indicateurs du brunissement enzymatique sont, d'après les travaux de Monsalve-Gonzales *et al.* et McHugh *et al.*, une augmentation de  $a^*$  et une diminution de  $L^*$  (Monsalve-

Gonzales 1993, McHugh 2000). Le suivi de la couleur des échantillons en milieu aqueux est donc un indicateur de l'activité de l'enzyme PPO.

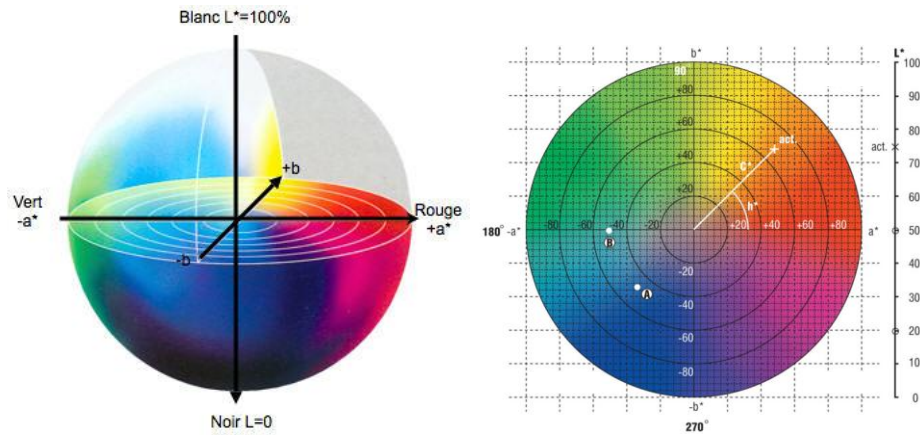


Figure 28: Système colorimétrique CIELab.

### I.5. Récapitulatif des échantillons de pommes

Le récapitulatif de tous les échantillons utilisés dans ce travail est représenté dans la figure suivante (Figure 29).

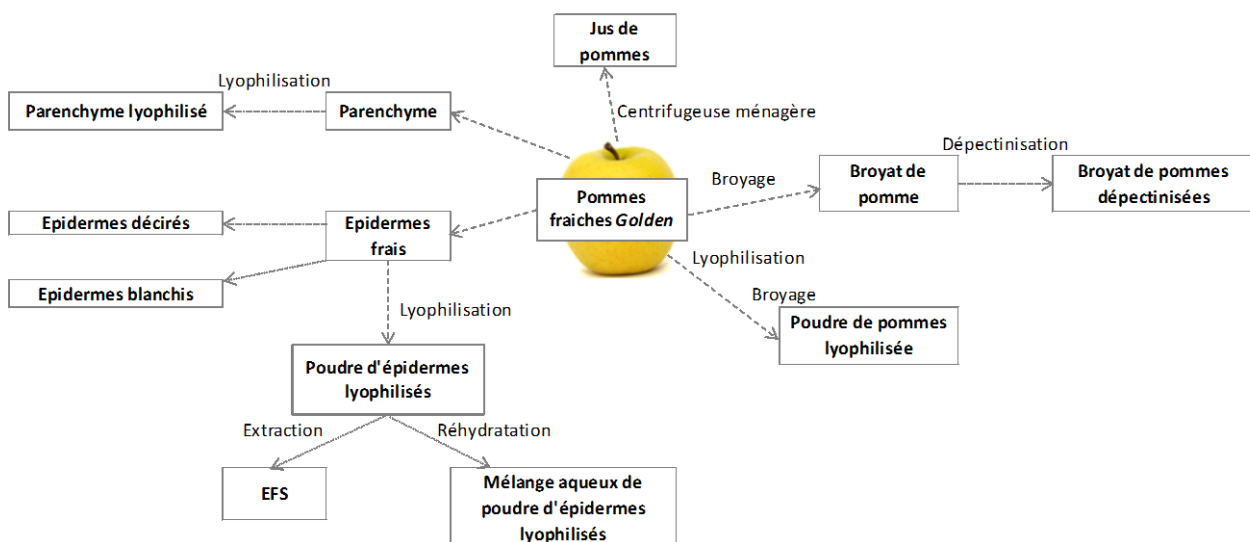


Figure 29: Schéma général des échantillons utilisés dans ce travail de thèse.

## II. Extraction des polyphénols

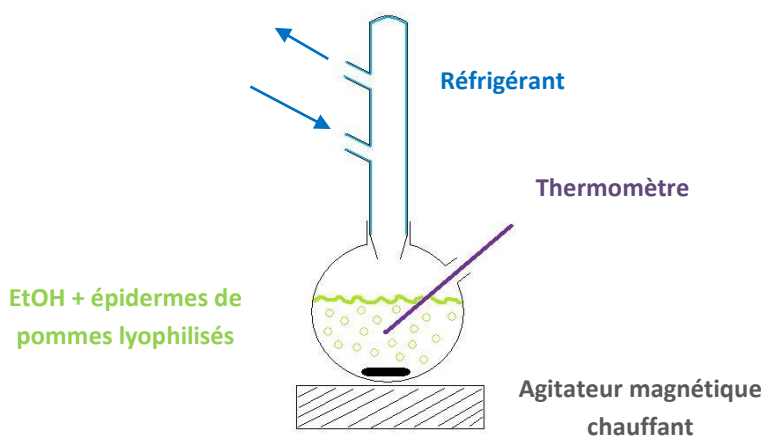
### II.1. Macération

Les épidermes de pommes *Golden* lyophilisés ont été extraits selon deux méthodes conventionnelles : une extraction MeOH/acétone et une macération éthanol/H<sub>2</sub>O.

Dans la première technique, dérivée de Muriel Colin-Henrion (Colin-Henrion 2008) et nommée par la suite MeOH/acétone, les épidermes sont broyés dans du méthanol (14 g pour 0,6 g de matrice). Après filtration de 20-25  $\mu\text{m}$  (Whatman n°4), les pelures de pommes sont resuspendues dans un mélange acétone/eau milli-Q 70:30 v:v et filtrées de nouveau. Les deux extraits sont combinés et évaporés à -0,9 bar à 30 °C avec un évaporateur rotatif (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Allemagne). Le concentré final est dissout dans 10 ml de méthanol pour quantification des polyphénols par CLHP.

Dans la seconde méthode, les épidermes de pommes sont macérés dans de l'éthanol à 96 % à 45 °C pendant 3 h sous agitation magnétique (100 ml de solvant pour 10 g de pelures). Le système est surmonté d'un réfrigérant afin de condenser les vapeurs d'éthanol et d'eau (Figure 30). La macération permet de comparer le rendement d'extraction des polyphénols par rapport à l'extraction par fluides supercritiques. Le ratio éthanol/matrice est donc identique à celui de l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique pour 1,1 kg de fluide extractant passé. Le surnageant est filtré avec du papier filtre (Whatman n°4, 20-25  $\mu\text{m}$ ) et injecté en CLHP.

Les solvants utilisés sont de type HPLC "grade" : éthanol absolu (Fisher), acétonitrile (HPLC Gradient grade, JT Baker), méthanol (HPLC Gradient grade, JT Baker) et acétone (Fisher).



*Figure 30: Schéma général du dispositif de macération.*

## II.2. Extraction par CO<sub>2</sub> supercritique

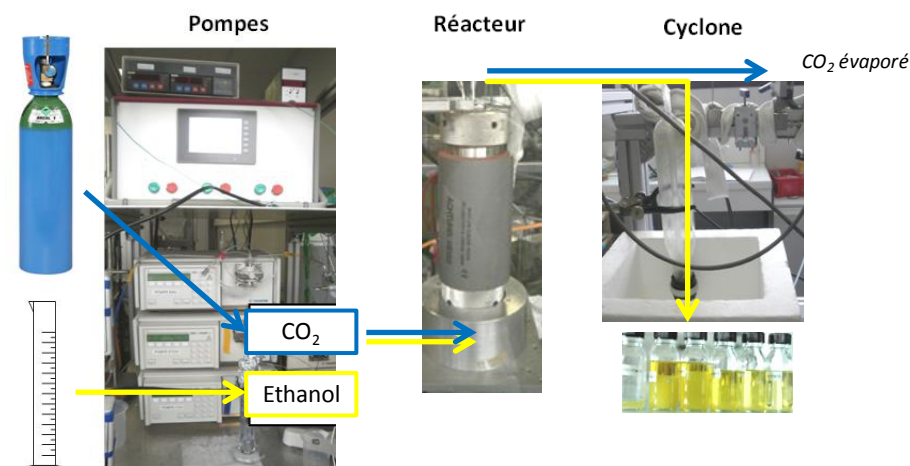
### II.2.1. Dispositif

Le système mis en place au laboratoire CBMN-UMR 5248 (Figure 31 a/b), sous la responsabilité de Pascale Subra-Paternault, est composé d'un réacteur d'extraction de 490 cm<sup>3</sup> (longueur 25 cm et diamètre interne de 5 cm), thermostaté par un ruban chauffant (Watlow) et alimenté par deux pompes (Gilson) de fluides (modèle 305, tête 25SC et 10SC pour le CO<sub>2</sub> et le cosolvant). Le débit des fluides est vérifié en début d'extraction par un débitmètre à gaz pour le CO<sub>2</sub> et la consommation du volume pour l'éthanol est calculée tout au long de l'essai (EtOH 96 %, Xylab, France). De plus, plusieurs vannes d'arrêt (Autoclave, France) sont disposées sur le système pour stabiliser les flux et l'extraction. Un by-pass est en place pour contourner l'extracteur. Une vanne finalise le dispositif et permet de faire varier le débit des fluides. L'installation comprend une unité de pré-refroidissement (Julabo, Allemagne) pour le CO<sub>2</sub> (conditionné en bouteille, CO<sub>2</sub> 99,8 %, Air liquide, France), une cartouche de préchauffage (TOP Industrie, France), une soupape et divers capteurs de pression et température. Les extractions sont réalisées à 50 °C et 25 MPa qui sont proches de la pression limite de la pression du dispositif. Le réacteur est rempli toujours de la même façon, en alternant des couches d'épidermes de pommes, préalablement pesées et de billes de verre de 2 mm afin d'éviter la compression de la matrice végétale lors de la pressurisation du système (Figure 32). Les solvants d'extraction CO<sub>2</sub> + EtOH circulent du bas vers le haut du réacteur.

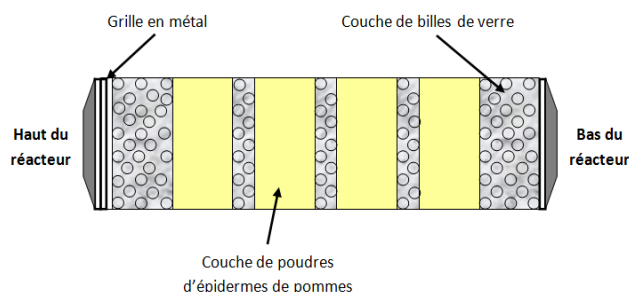


*Figure 31a: Schéma général du dispositif EFS.*





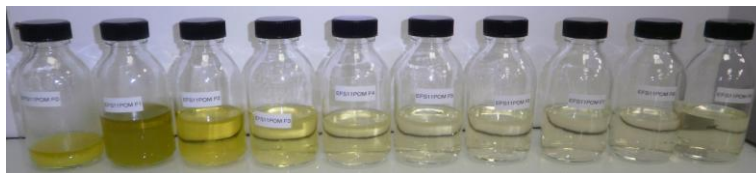
*Figure 31b: Schéma général du dispositif EFS. Les fluides sont représentés en jaune ( $\text{CO}_2$ ) et en bleu (EtOH).*



*Figure 32: Disposition du lit de pommes et de billes dans le réacteur.*

## II.2.2. Collecte des fractions

Les espèces dissoutes lors de l'extraction sont récupérées dans un collecteur cyclonique en verre où le tube collecteur, plongé dans de la glace et à atmosphère ambiante ( $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Les extraits fractionnés sont collectés (Figure 33), en changeant régulièrement le tube collecteur (environ toutes les 20 minutes).



*Figure 33: Fractions collectées.*



*Figure 34: Matière première avant extraction, à gauche et résidu FSC après extraction, à droite.*



Les fractions collectées sont analysées par gravimétrie, après évaporation de l'éthanol sous flux d'azote. La masse extraite totale est déterminée à partir de la somme des fractions collectées pendant le temps d'extraction. Les fractions sont également analysées en déterminant leur activité antioxydante et en dosant les polyphénols présents par CLHP.

La matière brute, les épidermes de pommes après EFS sont nommés résidu FSC (Figure 34). Elle est généralement d'aspect plus clair, plus sèche (environ 2 % d'eau) et plus friable que les épidermes de pommes lyophilisés. Les fractions et les résidus FSC sont stockés à -18°C.

Un dosage de sucres a été réalisé par Mme Carine Ferrand DUSA/INRA de Bordeaux-UMR 1332, sur les résidus FSC et les matrices brutes afin de déterminer les quantités d'amidon, de glucose, de fructose et de sucrose/saccharose (en équivalent  $\mu\text{mol}$  de glucose/mg de matière fraîche). Ceci va nous permettre par différence de connaître la quantité de sucres extrait par FSC.

### III. Protocoles de préparation des émulsions

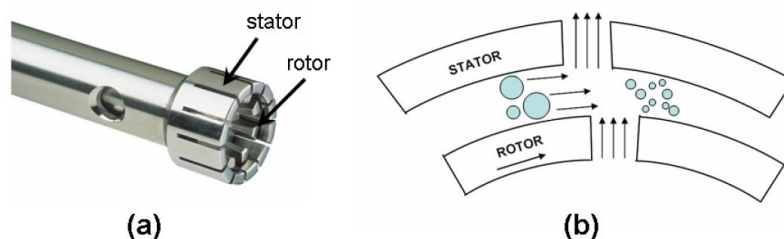
Diverses émulsions de type E/H ont été élaborées en utilisant pour la phase dispersée une huile neutre modèle : le miglyol<sup>®</sup> fourni par Stéarinerie Dubois & Fils, France (triglycérides à chaînes moyennes C8/C10). La stabilisation des émulsions sera assurée par du matériel végétal issu de la pomme ou d'une poudre de cacao délipidée. Nous explorerons ainsi les propriétés émulsionnantes de 2 poudres dont les mouillabilités sont très différentes. En effet, les 2 poudres sont préférentiellement hydrophiles mais la poudre de cacao présente a priori un caractère hydrophobe (et donc une amphiphilie) bien plus marqué que la poudre de pomme.

Les émulsions sont fabriquées à partir d'un mélange macroscopique de phase aqueuse et d'huile, la phase aqueuse contenant le matériel végétal est préalablement dispersée. La fragmentation des gouttes de phase dispersée est produite par agitation à l'Ultra-turrax<sup>®</sup> T25 (Janke & Kunkel, IKA). L'axe de cet appareil comporte deux pièces, un stator et un rotor, qui sont deux cylindres concentriques séparés par un entrefer. Les diamètres (du rotor et du stator) et l'entrefer sont reportés dans le Tableau 10 pour le modèle utilisé lors de ce travail de thèse : le modèle S25 N-10G.

*Tableau 10: Dimensions caractéristiques de l'axe Ultra-turrax<sup>®</sup> utilisé.*

Modèle	Diamètre stator (mm)	Diamètre rotor (mm)	Entrefer (mm)
S25 N-10G (PA)	10	7,5	0,35

L'extrémité de ces deux pièces comporte des indentations de forme carrée permettant la circulation du fluide (Figure 35). En raison de la grande vitesse de rotation, l'émulsion est aspirée automatiquement dans le sens axial, dans la tête de dispersion et comprimée ensuite, dans le sens radial, à travers les fentes du système rotor/stator. Les gouttes sont fragmentées dans le gradient de vitesse régnant dans l'entrefer (Figure 35). L'appareil est équipé d'un moteur permettant le mouvement du rotor à différents régimes : de 8 000 à 24 000 rotations par minute, ce qui correspond à des taux de cisaillement de l'ordre de  $15.10^3$  à  $45.10^3 \text{ s}^{-1}$ . L'écoulement turbulent mis en œuvre permet de fragmenter les gouttes mais les collisions très énergétiques provoquent des phénomènes de recombinaison (coalescence). Après quelques minutes, un régime stationnaire s'instaure où la distribution des tailles de gouttes résulte d'un couplage complexe entre la fragmentation et la recombinaison.



*Figure 35: a) Axe de l'Ultra-turrax® constitué du rotor et du stator (photo IKA), b) Principe de dispersion des gouttes.*

### III.1. Emulsions de pommes

Des émulsions ont été élaborées à partir de liquides (jus de pommes) ou de poudres issues de l'épiderme ou du parenchyme. Les morceaux d'épidermes ou de parenchyme sont broyés pendant 2 x 30 secondes à l'aide d'un moulin à café (Moulinex, France), centrifugés à 10 000 rpm pendant 2 min, et finalement séchés dans une étuve pendant 24 h à 50 °C. Sauf exception, les émulsions sont constituées de 20 % de miglyol et de 80 % d'une phase aqueuse dont l'extrait sec est variable. Elles sont obtenues par homogénéisation du mélange miglyol/phase aqueuse avec un Ultra-turrax® à 24 000 rpm pendant 10 min.

### III.2. Emulsions de cacao délipidé

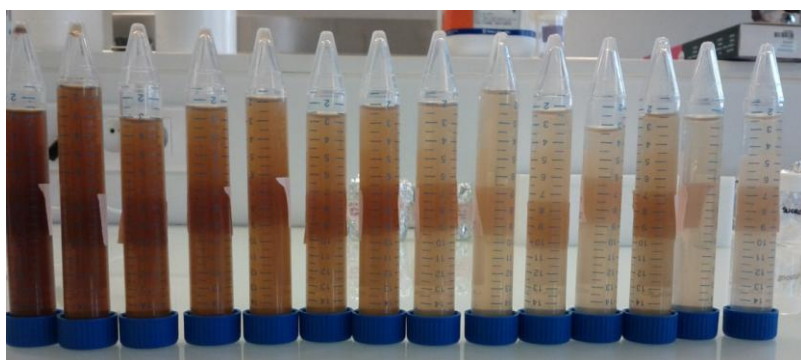
La poudre de cacao utilisée est issue du pressage d'une pâte pour en extraire le beurre de cacao. Le tourteau résiduel est ensuite broyé pour obtenir une poudre fine. La matière grasse résiduelle dans la poudre provoque à terme un mottage dû à la formation de ponts capillaires lipidiques entre les grains. Ce phénomène rend l'utilisation de la poudre en tant qu'auxiliaire de formulation difficile en raison de sa faible maniabilité. La délipidation totale de la poudre par extraction par CO<sub>2</sub> supercritique a été réalisée dans le cadre d'un autre projet.

Après délipidation, la poudre finale ne motte plus et sa maniabilité est préservée même après plusieurs mois de stockage.

Pour fabriquer les émulsions, les étapes suivantes sont réalisées de façon séquentielle :

- 1) Broyage de la poudre dans un moulin à café (Moulinex),
- 2) Dispersion de la poudre de cacao broyée dans l'eau milli-Q à une teneur massique comprise entre 5 et 10 %,
- 3) Ajout progressif de 20 % miglyol dans 80 % de phase aqueuse,
- 4) Cisaillement à l'Ultra-turrax® à la vitesse de 24 000 rpm pendant 1 min.

La phase aqueuse des émulsions peut contenir le cas échéant des protéines hydrosolubles libérées par la poudre. Afin d'évaluer leur éventuelle influence sur la stabilisation des émulsions, certaines poudres ont subi des opérations de lavage. Une solution à 5 % massique de poudre de cacao délipidée est centrifugée à 10 000 rpm pendant 20 min. La phase surnageante est collectée et le culot contenant l'essentiel de la poudre est redispersée dans la même quantité d'eau milli-Q. La même opération est répétée 14 fois. Sur la Figure 36, nous remarquons que la surnageant s'éclaircit au fur et à mesure. La teinte brunâtre peut être due à la libération de molécules dotées de groupements chromophores qui absorbent dans le visible telles que des polyphénols. Le culot obtenu à l'issue de la dernière étape de séchage est séché pendant 24 h à 50 °C dans une étuve et finement broyé dans un moulin à café avant d'être utilisé comme agent stabilisant dans les émulsions. Au cours de l'étude, nous comparerons l'aptitude à émulsionner des poudres non lavées, des poudres lavées et des eaux de lavage.



1 → 14  
*Figure 36 : Lavage de la poudre avec 14 centrifugations.*

## *2<sup>ème</sup> Partie : Caractérisation*

---

## I. Activité antioxydante

Plusieurs méthodes analytiques existent dans la littérature et mettent en œuvre divers mécanismes de réaction d'espèces d'oxydant, de conditions de réaction et d'expression des résultats (Gulcin 2012, Marc 2004). Nous pouvons citer la technique ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity), qui est une des méthodes reconnues dans la mesure de capacité antioxydante des aliments (Bisby 2008, Davalos 2004, Huang 2002, Dudonné 2009), la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) et TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), également nommée AAEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity) lorsque l'antioxydant de référence est l'acide ascorbique.

La capacité antioxydante dépend d'une multitude de facteurs et la comparaison des résultats entre chaque méthode est difficile (Prior 2005). Quelques publications mettent en avant la comparaison et la corrélation entre les méthodes les plus utilisées, comme ORAC et TEAC (Zulueta 2009, Serra 2010) (Tableau 11). La méthode TEAC est une méthode simple et peu coûteuse où l'ABTS<sup>+</sup> réagit rapidement avec les antioxydants (Wang 2004, Thaipong 2006). Une large gamme de molécule antioxydante contribue à ce pouvoir antioxydant dont la vitamine C et les polyphénols (Du 2009).

Nous avons décidé d'utiliser cette méthode dans nos travaux.

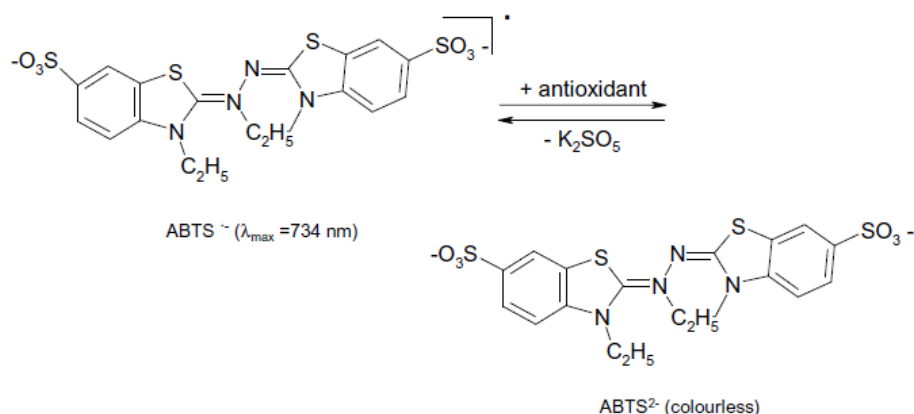
*Tableau 11: Quelques avantages et inconvénients des méthodes de mesure ORAC et TEAC (Zulueta 2009).*

Méthode	Inconvénients	Avantages
<b>ORAC</b>	Equipement coûteux Variabilité des résultats selon le matériel utilisé Sensible au pH Méthode longue	Usage biologique pertinent Standardisation Intégration du degré et du temps de réaction des antioxydants
<b>TEAC</b>	Nécessité de créer des radicaux libres d'ABTS Instabilité des radicaux libres dans le temps Pas de standardisation	Peu coûteuse Simple d'application pH stable Réaction rapide

La méthode AAEAC consiste à mesurer par spectrophotométrie la capacité du végétal à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber l'oxydation (Re 1999). La capacité antioxydante est évaluée en mesurant l'inhibition de l'oxydation d'un substrat déterminé (Tabart 2009, Dudonné 2009, Ciz 2010, Henriquez 2002). Le substrat est d'abord oxydé dans des conditions standards, puis l'étendue de l'oxydation à un temps final est mesurée.

Pour ce faire un radical cation est formé *in vitro* à partir d'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) ; Sigma-Aldrich, USA), en présence d'un

oxydant, le dioxyde de manganèse  $\text{MnO}_2$  (Fisher). L'inhibition de ce radical cation  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (de couleur bleu vert en solution aqueuse) par le donneur de protons conduit à la décoloration à 734nm de la solution (Figure 37). Cette décoloration traduit la capacité antioxydante de l'échantillon, exprimée par rapport à un autre antioxydant pris comme référence, la vitamine C. Les densités optiques sont rapportées sur une droite étalon afin de mettre en relation la DO et le pourcentage d'inhibition de l'échantillon, calculé en fonction de la concentration en acide ascorbique (Sigma-Aldrich, USA) (Figure 148 en annexe).



*Figure 37 : Réaction du radical ABTS en présence d'un composé antioxydant durant le test TEAC (Zulueta 2009).*

Concrètement, 3 x 0,5 g d'échantillon sont disposés dans des béchers contenant chacun 10 g de solution d'extraction éthanol/eau (50/50, v/v). Les échantillons sont broyés à l'Ultra-turrax® et centrifugés 10 min à 10 000 rpm. Le surnageant est récupéré et centrifugé de nouveau à 10 000 rpm pendant 10 min. 40 µl de surnageant sont prélevés et ajoutés à 1 690 µl d'ABTS dont la DO (Densité Optique) initiale est de 0,700. Le tube contenant le surnageant et l'ABTS est homogénéisé avec un vortex pendant 30 s puis la DO est lue au bout de 1 min à 734 nm avec un spectrophotomètre Helios γ (Thermo Electron Corporation, USA). Selon les résultats de Re *et al.* (1999), la réaction de la majorité des antioxydants avec l'ABTS est complète à 1 min, excepté pour les cyanidines et la glutathione qui montrent une inhibition jusqu'à 4 min de réaction. Ce qui signifie que la capacité antioxydante est relative à 1 min et non totale. Pour connaître la variabilité inter- et intra-échantillon, 6 mesures sont réalisées sur 3 sous-échantillons d'un même échantillon, soit 18 mesures/échantillon ( $n = 18$ , *écart type*).

Le pourcentage d'inhibition est calculé comme :

$$\%_{\text{inhibition}} = ((\text{DO}_i - \text{DO}_f) / \text{DO}_i) \times 100$$

où  $DO_i$  : densité optique initiale de la solution d'ABTS<sup>+</sup> ( $0,700 \pm 0,02$ ) et  $DO_f$  : densité optique finale de la solution d'ABTS<sup>+</sup> avec l'antioxydant à analyser (ou l'étalon vitamine C).

La capacité antioxydante AAEAC est exprimée en mg EAA (équivalent acide ascorbique) par g de poids sec.

## II. Quantification des polyphénols totaux

Les composés phénoliques peuvent être dosés soit dans leur totalité, soit individuellement, après extraction du matériel végétal (Ignat 2011). Les méthodes de dosage des composés totaux sont généralement basées sur l'oxydation de ces composés et le développement d'une coloration. La plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu, qui correspond à la réduction d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) (réactif de Folin-Ciocalteu) en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) (Singleton 1965). Le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans l'échantillon. Les produits de la réduction de couleur bleue présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Ce dosage des polyphénols présente des interférences avec des substances non phénoliques (les sucres, la vitamine C, les acides organiques...) (Prior 2005).

La réalisation de ce dosage s'effectue en deux temps : l'extraction des composés phénoliques totaux des échantillons, puis la mesure du taux de ces composés par la méthode Folin-Ciocalteu.

Précisément, 2,5 g d'échantillon sont mélangés à 12,5 ml d'un solvant méthanol/HCl 1,2 M (50/50, v/v). La réaction acide permet de cliver les liaisons entre les polyphénols et les parois végétales. L'ensemble est hermétiquement fermé puis chauffé pendant deux heures sous agitation à 90 °C dans un bain d'huile de silicone. A l'issue de ces deux heures les échantillons, une fois refroidis, sont centrifugés deux fois 10 min à 10 000 rpm et le surnageant est récupéré.

La teneur en composés phénoliques totaux extraits précédemment est ensuite quantifiée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Pour ce faire, 0,4 ml de surnageant sont mélangés à 1,5 ml d'eau milli-Q dans une fiole de 10 ml. Puis leur sont ajoutés 0,4 ml de réactif de Folin-Ciocalteu et, au bout de 6 min, 4 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 7 % pour stopper la réaction. Enfin, la DO de l'échantillon est lue au bout de 90 min, au spectrophotomètre UV-visible (Uvikon 933) à 760 nm. Pour chaque série d'échantillon, un blanc ne contenant aucun polyphénol et un témoin positif contenant de l'acide gallique (polyphénol) sont préparés et dosés en parallèle. Pour connaître la variabilité inter- et intra-échantillon, 5 mesures sont réalisées sur 3 sous-échantillons d'un même échantillon, soit 15 mesures/échantillon ( $n = 15$ , écart type).



Les quantifications sont effectuées par rapport à la gamme d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 149 en annexe). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique (GAE) par kg de poids sec. Un témoin possédant une concentration connue en acide gallique de 0,25 g/L permet d'ajuster la DO de référence par rapport à la gamme étalon.

### **III. Identification et quantification de polyphénols par CLHP**

#### **III.1. Méthode**

La méthode de dosage la plus largement utilisée pour séparer les composés phénoliques est la séparation par CLHP, souvent en phase inverse (principalement l'octadécylsilice ou C18). Les gradients d'élution comportent des proportions croissantes de méthanol ou d'acétonitrile, dans de l'eau acidifiée par de l'acide acétique (99,8 %, Acros Organic). Les composés sont élués par ordre de polarité croissante : les acides hydroxycinnamiques le sont avant les flavonoïdes. Pour ces derniers les aglycones sortent généralement après leurs dérivés glycosilés.

La détection est basée sur l'absorption caractéristique des polyphénols dans l'UV. La plupart des flavonoïdes ont en effet deux bandes d'absorption majeures : une à 320-385 nm, caractéristique de l'absorption du cycle B et une à 280-285 nm, caractéristique de l'absorption du cycle A. Ces bandes varient cependant en fonction des substitutions possibles sur les cycles. Les flavonols présentent un maximum d'absorption dans le jaune (350 à 360 nm) et les anthocyanes dans le rouge (520 à 530 nm). Pour les acides hydroxycinnamiques, ce maximum est à 320 nm. La détection UV par barrette de diode, à longueurs d'ondes multiples, permet ainsi de distinguer les classes de composés.

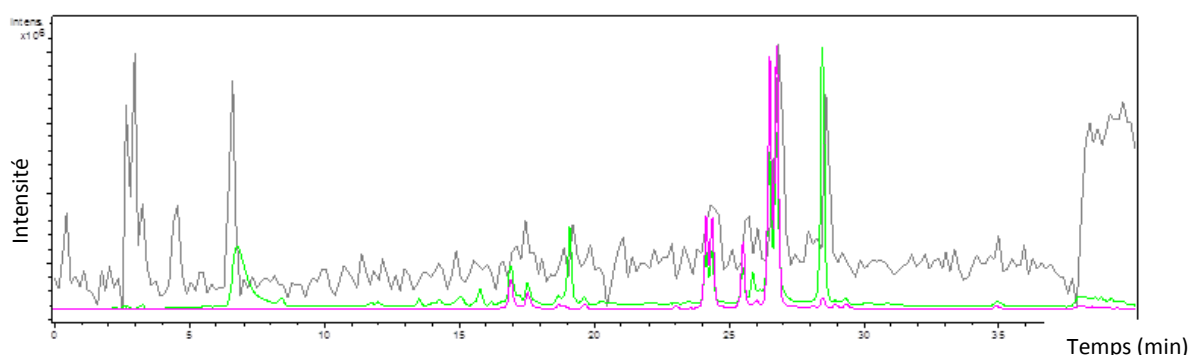
#### **III.2. Identification par spectrométrie de masse**

L'identification des polyphénols a été effectuée par un couplage CLHP à barrettes de diodes et spectrométrie de masse, au laboratoire d'Angers SONAS (EA 921), sur un échantillon d'épidermes de pommes lyophilisés et une fraction extraite par fluides supercritiques. Les analyses CLHP ont été exécutées sur un module de séparation 2695 Waters (Guyancourt, France), équipé d'un détecteur à barrettes de diode 2996 Waters. La séparation a été réalisée sur une colonne Phenomenex (Le Pecq, France) Luna 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), protégée par une pré-colonne (C18, 4 x 3 mm) à 30 °C. La phase mobile consiste en 0,1 % d'acide formique dans de l'eau milli-Q (éluant A) et de l'acétonitrile (éluant B), selon le gradient suivant : 4-10 % B (0-5 min), 10-45 % B (5-40 min) à un débit de 1 ml/min. Le volume d'injection est de 10 µl et la détection UV se fait à 280 nm et 350 nm.

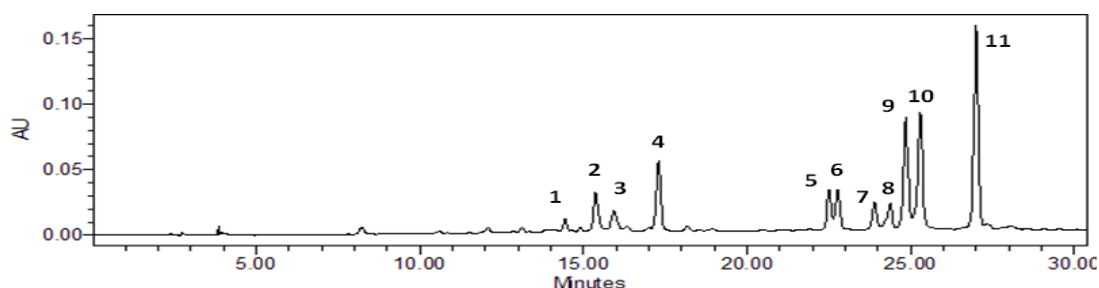
Le spectromètre de masse Bruker (Bremen, Allemagne) ESI/APCI (Electrospray Ionisation/Atmospheric Pressure Chemical Ionization) Esquire 3000+, en mode négatif, dans les

conditions suivantes permet de réaliser les analyses MS : Helium pour la phase gazeuse, amplitude énergétique de 1,3 V, gaz nébuliseur N<sub>2</sub> à 7 L/min et 30 psi de pression, température 340 °C, débit 1 ml/min, gamme de scan m/z 100-1000.

Les pics observés sur les chromatogrammes CLHP et TIC-MS (Total Ion Current-Mass Spectrometry) sont identifiés par corrélation avec les données de la littérature et par utilisation de standards purs. La Figure 38 présente les différents profils chromatographiques MS, UV 280 nm et UV 350 nm.



*Figure 38: Superposition des profils polyphénoliques des extraits EFS par TIC-MS (Total Ion Current-Mass Spectrometry) et UV. Les chromatogrammes gris, vert et rose correspondent respectivement aux représentations obtenues par TIC-MS, UV 280 nm et UV 350 nm.*



*Figure 39: Identification des polyphénols par HPLC à 280 nm.  
AU : Unité arbitraire*

L'identification de plusieurs pics a été possible par l'injection de composés standards commerciaux et comparaison des temps de rétention et des spectres UV-visibles avec ceux des étalons. Les caractéristiques des pics sont présentées dans le Tableau 12. Le profil chromatographique à 280 nm, Figure 39, met en évidence 11 pics détectés, correspondant aux composés suivants : 1/ catéchine, 2/ acide 5'caféoylquinique, 3/ non identifié, 4 / épicatechine, 5/ quercétine-3-O-glucoside, 6/ quercétine-3-O-galactoside, 7 / quercétine-3-O-arabinoside, 8/ non identifié, 9/ quercétine-3-O-xyloside, 10/ quercétine-3-O-rhamnoside et 11/ phloridzine.

Les pics numérotés de 7 à 10 et sont surtout visibles à 350-360 nm.

**Tableau 12:** Polyphénols identifiés de l'épiderme de pommes par couplage CLHP à barrettes de diodes et spectrométrie de masse.

$t_R$ : temps de rétention,  $\lambda$ : longueur d'onde maximale,  $[M-H]^-$  m/z: rapport masse<sub>ion</sub>/charge<sub>ion</sub>, MW: poids moléculaire.

Composé	$t_R$ (min)	UV $\lambda_{max}$ (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	MW (g/mol)
Catéchine	14,4	280	nd	290
Acide chlorogénique	15,37	298, 325	353	354
Epicatéchine	17,29	280	289	290
Quercétine-3-O-glucoside	22,5	256, 355	463, fragment 301	464
Quercétine-3-O-galactoside	22,76	256, 355	463, fragment 301	464
Quercétine-3-O-arabinoside	23,89	256, 355	433, fragment 301	434
Quercétine-3-O-xyloside	24,85	256, 354	433	434
Quercétine-3-O-rhamnoside	25,29	256, 350	447, fragment 301	448
Phloridzine	27	284	435, fragment 273	436

### III.3. Quantification par CLHP

La quantification des polyphénols a été réalisée à AGROTEC. La chaîne CLHP est un modèle Accela (Thermo) équipée d'un système de dégazage, d'une pompe quaternaire, d'un système d'injection automatique thermostaté et d'un détecteur à barrettes de diodes. La colonne utilisée est une colonne en phase inverse Nucléodur C18 Pyramid (250 x 4,6 mm, taille des particules 5  $\mu$ m, Macherey Nagel, Allemagne), thermostatée à 30 °C pendant les analyses. La phase mobile est un gradient avec un solvant A, une solution d'eau acidifiée à 2,5 % (v/v) par de l'acide acétique et un solvant B, une solution d'acétonitrile pur (Tableau 13). Les échantillons sont réfrigérés à 4 °C jusqu'à leur analyse. Le débit est constant à 1 ml/min et 10  $\mu$ l d'échantillon sont injectés. La plage de détection s'étend de 190 nm à 950 nm.

**Tableau 13:** Composition de la phase mobile pour la quantification des polyphénols par CLHP.

Temps (minute)	Solvant A %	Solvant B %
0	97	3
5	91	9
15	84	16
30	67	33
37	50	50
40	10	90
52	10	90
57	97	3
75	97	3

Les échantillons de pomme (épidermes frais ou poudre de pommes lyophilisée) sont préparés selon la méthode dite MeOH/acétone, issue des travaux de Muriel Colin-Henrion (Colin-Henrion 2008). Ainsi, 300 mg d'échantillon sont extraits dans 7 ml de méthanol pendant 5 min puis filtrés sur papier filtre 0,20-0,25  $\mu\text{m}$  (Whatman n°4). Le filtrat est récupéré et l'échantillon brut est ré-extrait avec 4 ml d'un mélange eau milli-Q/acétone (70/30, v/v) pendant 5 min. Le deuxième filtrat est ajouté au premier, puis évaporé à -0,9 bar et à 30 °C pour être concentré. Le résidu obtenu est redissout dans 5 ml de méthanol pur.

Nous avons procédé différemment pour la quantification des fractions obtenues en supercritique. Les extraits après filtration ont directement été injectés en CLHP.

La plupart des composés phénoliques étudiés sont identifiés et quantifiés grâce à la réalisation de gammes de calibration avec des standards commerciaux, achetés en fonction de l'identification précédente (Figure 150 en annexe). Les standards de polyphénols (HPLC-grade, pureté > 97 %) ont été achetés chez Sigma-Aldrich® (France) et Extrasynthèse (France) : (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, phloridzine, acide chlorogénique, quercétine-glucoside, quercitrine (quercétine-arabinoside) et hyperoside (quercétine-galactoside).

L'utilisation des standards ou la quantification des polyphénols par rapport à un équivalent est spécifiée dans le Tableau 14.

**Tableau 14 :** Récapitulatif des méthodes utilisées pour caractériser les profils de polyphénols. MS : spectrométrie de masse, Eq : équivalent.

Composé phénolique	Longueur d'onde de détection en HPLC	Temps de rétention	Identification	Quantification
Catéchine	280 nm	10,5 min	Standard HPLC +MS	Standard HPLC
Acide 5'-caféoylquinine	280 nm	11,8 min		
Epicatéchine	280 nm	13,8 min		
Quercétine-glucoside	360 nm	22,1 min		
Quercétine-galactoside		22,3 min		
Quercétine-arabinoside		23,4 min		
Quercétine-xyloside		24,2 min		Eq. Quercétine-arabinoside
Quercétine-rhamnoside		24,7 min		
Phloridzine	280 nm	25,3 min		Standard HPLC

## IV. Activité antiproliférative

### IV.1. Matériel biologique et conditions de culture

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives et ayant en théorie une capacité illimitée de division. La lignée HT-29 a été établie en culture en 1964 par le Dr. Jorgen Fogh, à partir d'un adénocarcinome colique (Fogh 1975). Les

cellules HT-29 poussent en multicouches et sont majoritairement indifférenciées. La prolifération est assurée dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère humide (95 %) et à 5 % de CO<sub>2</sub>, au laboratoire CBMN-UMR 5248, sous la responsabilité de M. Hadj Sassi. Le milieu de culture est remplacé tous les deux jours afin d'apporter les éléments nécessaires à la croissance des cellules. L'ensemencement est réalisé à hauteur de  $2,4 \times 10^4$  cellules par puits dans des plaques de 24 puits.

Dans notre étude, les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) contenant du glucose (4,5 g/L), du pyruvate, de la glutamine, 10 % de sérum fœtal de veau (10 X), 1 % de Pénicilline/Streptomycine et de 1 % d'acides aminés non indispensables (100 X). Le glucose et le pyruvate fournissent un apport énergétique immédiat aux cellules alors que la glutamine sert de source secondaire d'énergie pour le métabolisme, pour son apport en azote. Les acides aminés non-essentiels sont ajoutés au milieu de culture pour remplacer ceux qui ont été épuisés pendant la croissance cellulaire. Ils stimulent la croissance et prolongent la viabilité des cellules. Le sérum fœtal de veau apporte, entre autre, des facteurs de croissance et, neutralise les composés toxiques. Enfin, les antibiotiques diminuent le risque de contamination bactérienne.

#### IV.2. Préparation des échantillons à tester

Les extraits d'épidermes de pommes biologiques obtenus par extraction CO<sub>2</sub>+EtOH supercritiques vont être testés sur les cellules HT-29 afin de déterminer leur activité biologique. Ces extraits bruts se présentent comme des particules en suspension dans un milieu éthanolique à 96 %, de couleur jaune.

L'activité inhibitrice est généralement exprimée en fonction de la concentration de l'échantillon, c'est à dire de la quantité inoculée par millilitre de milieu de culture, il est donc nécessaire de connaître la concentration exacte qui va être inoculée. Le protocole de préparation suivant est appliqué à toutes les fractions testées par la suite :

- 10 ml d'extrait brut ( $V_x$ ) sont évaporés sous flux d'azote pour obtenir un résidu  $M_x$ .
- Le résidu  $M_x$  est repris dans 2 ml d'éthanol ( $V_y$ ) afin de resuspendre l'échantillon qui a été concentré 5 fois.
- La suspension est centrifugée et le surnageant récupéré. Cette phase constituera la solution inoculée dans les cellules HT-29. Le culot est pesé ( $M_y$ ) après évaporation de l'éthanol résiduel.
- La concentration du surnageant est calculée comme étant  $(M_x - M_y)/V_y$ .

- La quantité inoculée est :  $\left( \frac{M_x - M_y}{V_y} \right) \times V_{inoculé}$

Seul le surnageant est inoculé, ce qui induit qu'un tri dans les espèces est fait. Le culot a été repris dans de l'eau et inoculé aux cellules, mais aucune activité inhibitrice n'a été détectée. Comme ce culot représente les matières initialement en suspension dans l'extrait brut, plus celles précipitées lors de la phase de concentration, nous pouvons en déduire que les "insolubles" ne contribuent pas à l'activité à laquelle nous nous intéressons dans cette étude.

#### **IV.3. Suivi de la prolifération et de la viabilité cellulaire**

L'évaluation de la viabilité cellulaire est assurée par deux techniques. D'une part, l'usage d'un compteur de cellules CASY® (modèle DT), qui après étalonnage, permet d'estimer le nombre de cellules viables en se basant sur la taille, la polarité de la membrane cellulaire et de la mesure de la résistance entre deux électrodes en utilisant un tampon spécifique.

D'autre part, la technique MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) est basée sur la réduction du sel MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. L'anneau de tétrazolium du MTT de couleur jaune est transformé, par les cellules vivantes, en cristaux de formazan de couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule).

Concrètement, après exposition des cellules aux extraits testés et 3 lavages dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline), 250 µL d'une solution de PBS à 5 g/L de MTT sont ajoutés dans chaque puit. Les plaques sont ensuite incubées 3 heures à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Après cette étape, les surnageants sont éliminés et le formazan formé dans les cellules est solubilisé pendant une heure dans 200 µL d'isopropanol, sous agitation douce et à l'abri de la lumière. Un simple dosage de la densité optique à 570 nm par spectroscopie (Nanodrope) permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement.

#### **IV.4. Détermination du « mode d'action » des extraits sur les cellules HT-29**

Des méthodes de fluorescence et de coloration ont été appliquées sur les cellules HT-29 afin de comprendre la décroissance de viabilité cellulaire et de mettre en évidence les mécanismes impliqués lors de l'inoculation des extraits FSC.

L'une des caractéristiques de l'apoptose est la dégradation de l'ADN. La méthode TUNEL (Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling) est basée sur la fluorescence et permet la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN. C'est une technique qui consiste à ajouter aux extrémités 3'-OH, un nucléotide marqué. Le clivage de l'ADN peut produire des coupures simples ou doubles brins. Les deux types de fractures peuvent être détectés en marquant les extrémités 3'-OH libres à l'aide de nucléotides modifiés (biotine-UTP, fluorescéine-dUTP) intervenant dans une réaction enzymatique. L'enzyme terminal

desoxynucléotidyl transférase (TdT) catalyse la polymérisation sans matrice nucléaire des desoxyribonucléotides des extrémités 3' de l'ADN double et simple brin.

Après fixation au PFA (4 %) et perméabilisation au Triton 100 X, puis rinçage au PBS, les cellules sont incubées avec le réactif TUNEL (100 µL) contenant l'enzyme TdT (Désoxynucléotidyl-transférase terminale) et le marqueur, la fluorescéine-dUTP. Pendant la période d'incubation (1 h dans un incubateur à 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub>), l'enzyme catalyse l'addition du marqueur sur les groupes 3'-OH libres des simples et doubles brins d'ADN. Après lavage, le marqueur incorporé au niveau des sites ADN endommagés est visualisé par microscopie à fluorescence (Roche 2006). Cette technique nécessite la préparation d'un contrôle négatif, l'incubation des cellules sans enzyme et un contrôle positif où les cellules ont subi l'action de la DNaseI (3 U/mL).

La coloration de Hoechst a également été mise en œuvre pour visualiser la morphologie des cellules par marquage de leur noyau. Ces marqueurs ont la capacité de se lier à des molécules d'ADN, les noyaux et les mitochondries apparaissent donc fluorescents sous lumière ultraviolette. Les observations ont ensuite été réalisées sur un microscope à fluorescence.

L'actine Fibrillaire (aussi appelée Actine F) est une protéine importante, constituant le cytosquelette des cellules eucaryotes, ainsi que des fibres musculaires. Elle a un rôle dans le maintien des édifices structuraux et des jonctions adhérentes de la cellule. Durant ce travail, nous avons émis l'hypothèse qu'une dégradation ou un changement de ces fibrilles d'actine engendrait une mortalité cellulaire.

De ce fait, les protéines d'actine F ont été colorées à la phalloïdine Alexa Fluor 488, afin d'observer leur structure. La phalloïdine se lie spécifiquement à l'interface entre les sous unités d'actine F, son dérivé fluorescent permet de visualiser les filaments d'actine en microscopie optique. Pour procéder à la coloration, des plaques Labtek de 4 puits sont utilisées. L'ensemencement est réalisé avec  $1,2 \times 10^4$  cellules par puit. Après croissance des cellules, en présence des extraits FSC, les cellules sont lavées 3 fois au PBS (Phosphate Buffered Saline composé de 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; à pH = 7,4) puis fixées avec 4 % de PAF (Paraformaldéhyde) pendant 20 min à température ambiante (23 °C). Le PFA crée des liaisons covalentes avec les groupes NH<sub>2</sub> des protéines. Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 5 min avec une solution de triton 100 X (1 %) dans du PBS. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées avec de la phalloïdine fluorescente (1/40<sup>ème</sup> dans 1 % de BSA Bovine Serum Albumin) pendant 30 min à la température ambiante (23 °C) et à l'obscurité puis relavées 3 fois au PBS. Les cellules sont finalement observées par microscopie optique.



## V. Caractérisation des émulsions

### V.1. Microscopie optique

La microscopie optique est une technique très performante pour la caractérisation des systèmes colloïdaux et permet d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives, souvent essentielles à la compréhension générale des systèmes. Dans le cas des émulsions de Pickering, cette technique permet d'évaluer la taille des gouttes, d'observer leur forme, d'estimer les dispersions de tailles, de déterminer l'état d'agrégation et d'identifier certaines instabilités comme la coalescence. Les observations microscopiques sont effectuées avec un microscope inversé (Axiovert 100, Zeiss, Allemagne) dont la résolution est de 200 nm. Le microscope est équipé d'une caméra pour la prise d'images.

Les émulsions formulées au cours de cette étude n'ont pas toujours été mesurables par granulométrie laser en raison de leur état d'agrégation. La distribution de tailles a donc été obtenue par traitement d'images issues de la microscopie optique. Le diamètre d'au moins une cinquantaine de gouttes est mesuré afin de déterminer le diamètre moyen en volume, noté  $D(4,3)$ , défini par :

$$D(4,3) = \frac{\sum_i N_i d_i^4}{\sum_i N_i d_i^3}$$

où  $V_i$  et  $N_i$  sont respectivement le volume et le nombre des gouttes de diamètre  $d_i$ .

Dans tous les autres cas, la microscopie optique a été utilisée pour contrôler la taille donnée par la granulométrie laser.

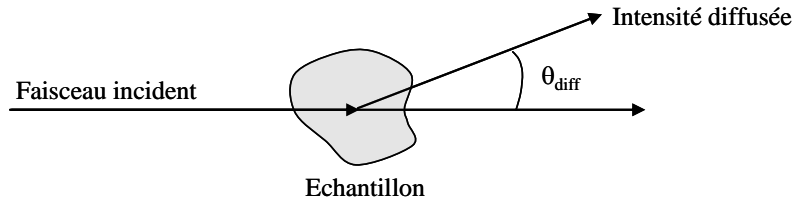
### V.2. Granulométrie laser

Lorsque les tailles de gouttes et l'état d'agrégation des émulsions le permettaient, la caractérisation des distributions de tailles des émulsions a été effectuée grâce à un appareil commercial (Mastersizer hydro 2000, Malvern) doté d'un système de mesure des diamètres par diffusion statique de la lumière.

Lorsqu'un élément de matière est soumis à un rayonnement lumineux, certains rayons interagissent avec le moment dipolaire des molécules. Ces molécules sont alors excitées et répondent au champ électromagnétique par une oscillation de leur densité électronique. Chaque molécule se comporte alors comme un petit dipôle oscillant qui rayonne dans tout l'espace un champ électromagnétique diffusé : c'est le phénomène de diffusion du rayonnement.

Considérons alors un système modèle, constitué de gouttes de même taille. Dans la technique de diffusion statique de la lumière, la moyenne temporelle de l'intensité diffusée,  $I(\theta_{\text{diff}})$ , est mesurée en fonction de l'angle de diffusion  $\theta_{\text{diff}}$  (Figure 40).





*Figure 40: Schéma de principe d'une expérience de diffusion statique de la lumière.*

Cette moyenne se décompose en un produit de trois termes :

$$I(\theta_{\text{diff}}) = K.P(\theta_{\text{diff}}).S(\theta_{\text{diff}}),$$

où  $P(\theta_{\text{diff}})$  est le facteur de forme,  $S(\theta_{\text{diff}})$ , le facteur de structure et  $K$ , une constante de proportionnalité indépendante de  $\theta_{\text{diff}}$  :

$$K \propto \frac{v\phi}{\lambda^4}$$

où  $\lambda$  est le volume d'une particule et  $\phi$  la fraction volumique.

$P(\theta_{\text{diff}})$  est une fonction qui dépend de la forme, de la taille des objets diffusants et  $S(\theta_{\text{diff}})$  une fonction rendant compte des interférences qui résultent des interactions entre les gouttes.

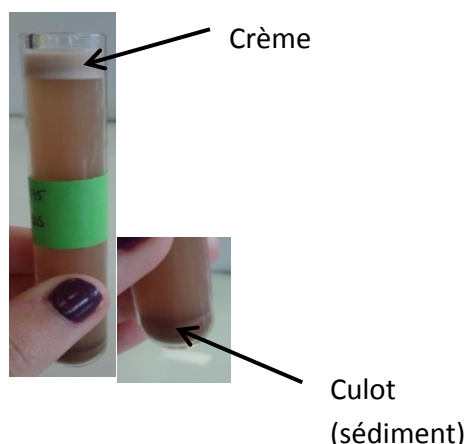
Dans le cas d'un échantillon très dilué ( $\phi \rightarrow 0$ ), il y a plus de corrélation spatiale entre les gouttes qui se comportent alors comme des émetteurs incohérents. Dans ce régime, le facteur de structure devient égal à 1 ( $S(\theta_{\text{diff}}) \rightarrow 1$ ). La mesure de  $I(\theta_{\text{diff}})$  permet alors de déterminer à une constante près le facteur de forme  $P(\theta_{\text{diff}})$  des gouttes. En faisant coïncider le facteur de forme expérimental avec le facteur théorique, issu de la théorie exacte de Mie, le diamètre des gouttes peut être déterminé.

En général, les échantillons ne sont pas monodisperses, mais sont constitués d'un mélange de gouttes de diamètres différents : chaque goutte diffuse la lumière, ce qui se traduit par un diagramme de diffusion  $P_i(\theta_{\text{diff}})$  caractéristique de son diamètre  $d_i$ . L'intensité diffusée mesurée correspond donc à la somme des facteurs de forme pondérée par la fraction volumique des gouttes de diamètre  $d_i$ . Une déconvolution mathématique de ce signal complexe est réalisée par l'appareil pour obtenir la distribution granulométrique de l'échantillon. Les émulsions seront caractérisées en termes de diamètre moyen en volume  $D(4,3)$  des gouttes, tel que défini au paragraphe V.I. L'utilisation de la théorie de Mie requiert comme variables d'entrée l'indice de réfraction  $n$ , et l'indice d'adsorption  $k$ , des phases continues et dispersées. Les indices suivants ont été adoptés :

- pour la phase aqueuse :  $n_{\text{eau}}=1,33$  et  $k_{\text{eau}}=0$
- pour la phase huile :  $n_{\text{miglyol}}=1,448$  et  $k_{\text{miglyol}}=0,01$

Les émulsions sont pré-diluées d'un facteur 10 environ dans une phase aqueuse à 1 % massique de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS). Le SDS est un tensioactif anionique capable de défaire les amas de gouttes ou de particules. Quelques gouttes de l'émulsion pré-diluée sont ensuite introduites dans le cône d'injection du granulomètre rempli d'eau pure (environ 200 ml) et agité par une hélice rotative.

Les émulsions fabriquées dans le cadre de cette thèse ont été stabilisées par du matériel de plante (poudre de pomme ou poudre de cacao). Dans le cas de la poudre de cacao, nous avons observé des écarts significatifs entre le diamètre moyen des gouttes mesuré par granulométrie laser et celui issu des observations au microscope optique. Nous attribuons cette différence à la présence de particules végétales résiduelles dans la phase aqueuse (non adsorbées) qui sont détectées et non différenciées en granulométrie laser. Nous avons donc procédé à une séparation préalable des 2 populations par décantation. Les gouttes d'huile et les particules de cacao ayant des densités respectivement supérieures et inférieures à celle de la phase aqueuse, une séparation spatiale se produit spontanément lorsque les émulsions sont laissées au repos pendant environ 24h. Les gouttes migrent vers le haut du récipient où elles forment une crème alors que les particules de cacao non adsorbées sédimentent et forment un culot (Figure 41). La crème est collectée, diluée dans une solution de SDS et sa distribution granulométrique est ensuite mesurée.



*Figure 41:* Aspect macroscopique des émulsions à base de poudre de cacao après 24 h de décantation.



## *Chapitre C. Résultats et Discussion*

---

## *I.*

### *Incidence des prétraitements sur la préservation des antioxydants d'épidermes de pommes Golden Delicious*

---

Dans un contexte de valorisation de coproduits, se pose le problème plus général de la conservation de ces produits avant leur transformation/valorisation. Dans le cas particulier de la pomme, la valorisation repose sur les propriétés antioxydantes de ce fruit qui sont en partie dues à sa richesse en polyphénols. Or ces composés sont les substrats de deux enzymes et leur dégradation est responsable du brunissement constaté quand nous tranchons une pomme par exemple. Cette première partie présente les différents essais relatifs à la préservation de la capacité antioxydante des épidermes de pommes *Golden*, soit lors de la lyophilisation ou d'un broyage, soit lors d'un traitement thermique de blanchiment. Une solution alternative d'inactivation du brunissement par ajout de poudres ou de jus d'autres fruits est présentée.

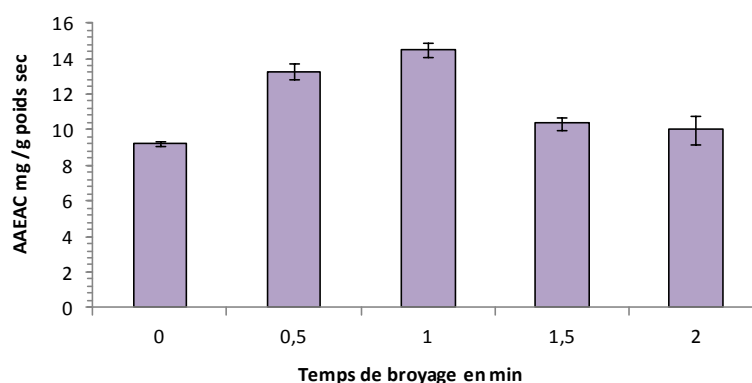
## **I. Préparation des échantillons pommes et effet sur la capacité antioxydante des épidermes**

Tous les produits de pommes *Golden Delicious* étudiés au cours de cette thèse ont été très peu transformés, seulement une lyophilisation et un broyage à température ambiante (24 °C). Les procédés industriels de transformation dégradent les polyphénols (Colin-Henrion 2008, Chanforan 2010), il faut donc s'assurer que les deux procédés utilisés ici (broyage et lyophilisation) n'ont pas dégradé les molécules présentes dans l'épiderme de pommes et qui possèdent une capacité antioxydante. D'autre part, la littérature met en évidence que la taille des particules peut jouer sur le contenu en polyphénols d'extraits et en améliore alors la capacité antioxydante (Wei 2012, Zhang 2014). Le broyage est un paramètre important à prendre en compte. Il permet de mettre à disposition un maximum de molécules d'intérêt en les libérant des parois végétales.

### **I.1. Broyage des épidermes frais de pommes**

Le broyage permet de réduire la taille des particules de la matrice pomme, mais également d'éclater les cellules végétales et de rendre plus disponibles des composés d'intérêt pouvant être liés aux constituants des parois végétales, par exemple les polysaccharides (Renard 2001, De Freitas 2003, Le Bourvellec 2005b). De ce fait, un broyage des épidermes dans un milieu EtOH/H<sub>2</sub>O devrait augmenter la quantité de polyphénols de l'échantillon, en libérant les molécules d'intérêt dans le milieu liquide (Pinelo 2007b). Attention cependant à l'échauffement des échantillons lors du broyage qui peut être un atout en dégradant davantage les parois végétales, mais la température peut également dégrader les molécules d'intérêt (Cacace 2003). De ce fait, les facteurs température et temps d'extraction semblent être d'importants facteurs à prendre en considération (Renard 2011).

Dans notre étude, les échantillons sont d'abord broyés au blender pendant 1 min avant d'être homogénéisés à l'Ultra-turrax®. Le temps t<sub>0</sub> de la Figure 42 correspond à un broyat d'épidermes ayant simplement subi le broyage au blender. Les temps supplémentaires d'homogénéisation sont réalisés avec l'Ultra-turrax® à une vitesse de 9 500 tr/min. Les temps d'homogénéisation sont courts (de 0,5 min à 2 min) afin d'éviter tout échauffement de l'échantillon et une éventuelle dégradation.



*Figure 42 : Impact d'un broyage au blender + homogénéisation sur la capacité antioxydante d'épidermes frais de pommes Golden Delicious dans un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O 50/50. (n = 18, écart type)*

AAEAC: Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity

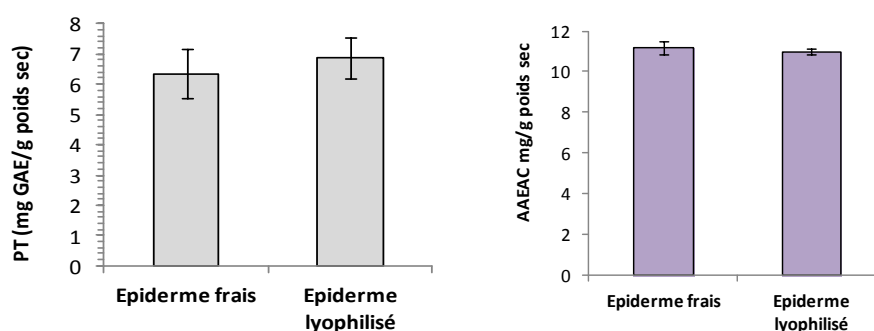
Un temps additionnel de 1 min d'homogénéisation à l'Ultra-turrax® permet d'obtenir la plus grande activité antioxydante, exprimée en mg d'équivalent acide ascorbique (Figure 42). La capacité antioxydante augmente au cours du broyage avec 9,3 mg EAA, 13,3 mg EAA et 14,5 mg EAA/g de poids sec pour des temps respectifs de 0 min, 0,5 min et 1 min. Des temps supérieurs à 1 min dégradent les molécules ayant une activité antioxydante puisque les valeurs de cette activité diminuent de 10,3 mg EAA et 10 mg EAA/g poids sec pour des temps d'homogénéisation de 1,5 min et 2 min. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'homogénéisation dégrade les composés thermosensibles malgré la libération des polyphénols des parois végétales. Visuellement, les particules obtenues lors d'un broyage de 2 min sont de plus petites tailles que celles broyées à 0,5 ou 1 min. L'observation au microscope des broyats met en évidence des amas cellulaires de plus en plus petits en fonction d'un temps de broyage plus important (non montré).

A partir de ces observations, le broyage semble un facteur important à prendre en compte dans l'élaboration d'un extrait riche en composés antioxydants. Il permet non seulement l'éclatement des cellules et donc la libération des polyphénols vacuolaires et liés aux parois, mais il augmente également la surface de contact entre le solvant et la matrice, tout en réduisant la distance sur laquelle le soluté devra diffuser au sein de la particule avant d'arriver au contact du solvant.

## I.2. Lyophilisation des épidermes frais de pommes

Pour les travaux de thèse, il fallait pouvoir disposer de coproduits de pommes durant toute l'année alors que la récolte de pommes est saisonnière. Il faut donc obtenir un matériau stable dans lequel les polyphénols ne se dégradent pas en cours du stockage. Les échantillons de pommes, notamment les épidermes fraîchement pelés, sont immédiatement stockés à -18 °C pour stopper l'activité des enzymes responsables du brunissement et de la dégradation des polyphénols. Les épidermes sont ensuite lyophilisés, réduits en poudre et conservés sous vide. Il était donc important de vérifier que la lyophilisation n'avait pas d'impact sur les polyphénols totaux et sur le potentiel antioxydant global. La matrice devenant poreuse suite à l'élimination de l'eau, une plus grande surface de contact entre l'oxygène et les constituants peut favoriser des réactions de dégradation qui seront à l'origine d'une diminution de la concentration en molécules d'intérêt. Les travaux de Georgé *et al.* (2011) sur la tomate ne montrent pas d'influence de la lyophilisation sur les polyphénols totaux alors qu'elle impacte d'autres nutriments de la tomate. D'autre part, l'étude de 3 procédés de séchage de pommes *Granny Smith* permet de conclure que la lyophilisation est la meilleure technique pour conserver les polyphénols (92 % sont préservés) (Henriquez 2013b) et plus précisément, les flavonols comme les quercétines- glucoside et -galactoside (Torres 2010).

La Figure 43 montre que la lyophilisation n'a pas d'influence ni sur la quantité de polyphénols totaux ni sur l'activité antioxydante des épidermes de pommes *Golden*. La quantité respective de polyphénols totaux pour les épidermes frais et lyophilisés est stable, soit 6,35 mg GAE et 6,90 mg GAE/g poids sec et l'activité antioxydante est de 11,17 mg EAA à 11 mg EAA/g poids sec.



**Figure 43 :** Impact de la lyophilisation d'épidermes frais de pommes *Golden* sur ■ la quantité de polyphénols totaux et ■ la capacité antioxydante globale. ( $n = 15$ , écart type pour les polyphénols totaux et  $n = 18$ , écart type pour la capacité antioxydante)

GAE : Gallic Acid Equivalent, PT : polyphénols totaux, AAEAC : Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity



Cette technique peut donc être utilisée pour conserver nos échantillons. La lyophilisation se fait à 25 °C (température ambiante) pendant 48 heures après 24 heures de congélation à -18 °C. Les épidermes de pommes *Golden* sont plus facilement conservables car 80 % de leur poids est perdu par élimination de l'eau. L'échantillon sous forme de poudre est ensuite stocké dans des sacs sous vide (sans oxygène) et à l'abri de la lumière. Il est donc stable d'un point de vue microbiologique et nutritionnel. La lyophilisation est donc un moyen de déshydrater les végétaux sans impacter leurs composés nutritionnels. Cependant, sur des volumes plus importants à l'échelle industrielle, il sera nécessaire de trouver des alternatives à cette technique car elle est onéreuse.

## **II. Inactivation des enzymes responsables du brunissement sans dégradation des polyphénols**

Les échantillons de pommes ont été lyophilisés et réduits en poudre. Par la suite, nous nous sommes aperçus en réincorporant les poudres dans une matrice aqueuse que la lyophilisation n'était pas une méthode suffisante pour inactiver irréversiblement les enzymes PPO et POD. En effet, les échantillons réhydratés brunissent, ce qui signifie que les enzymes responsables de ce brunissement sont toujours actives après la lyophilisation et qu'elles dégradent les polyphénols présents dans ces échantillons. Malec *et al.* (2014) ont ainsi montré que la classe des polyphénols, les acides hydroxycinnamiques et notamment l'acide 5'-caféoylquinique sont des substrats préférentiels de la polyphénoloxydase.

De ce fait, des solutions ont dû être mises en place pour inactiver les enzymes PPO et POD et préserver les antioxydants présents dans les pommes. Les procédés actuels sont le plus souvent les traitements thermiques et/ou l'addition d'agents antibrunissement. Ces additifs sont classés selon différentes catégories : les acidifiants, les agents réducteurs, -chélateurs, -complexant, les inhibiteurs d'enzymes, ... (Garcia 2002, Wolfe 2003).

Dans une démarche de "naturalité" pour le consommateur et dans le contexte actuel sociétal de développement durable, il est important de développer en priorité une voie non chimique, en trouvant un traitement suffisant pour inactiver les enzymes tout en préservant les polyphénols. Les solutions envisagées sont basées sur des publications montrant que l'acide ascorbique (Jeong 2008, Chow 2011) et l'acide citrique sont des agents antibrunissement et que des traitements thermiques inactivent les enzymes polyphénoloxydases (Son 2001, Chiabrando 2012, Hakkim 2012).

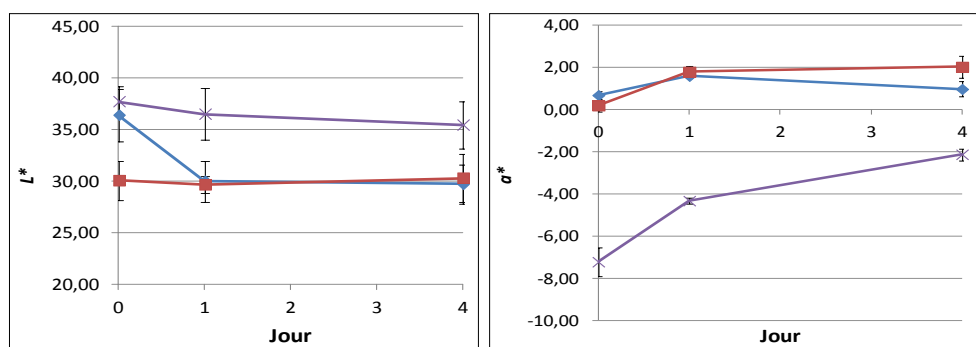
### **II.1. Réhydratation des poudres et brunissement enzymatique**

Les poudres d'épidermes de pommes ont été réhydratées dans de l'eau distillée pour simuler une éventuelle réincorporation dans un produit fini ayant une teneur en eau importante. L'ajout

d'eau distillée à une poudre de pommes forme une compote qui brunit rapidement, ce brunissement met en évidence une reprise d'activité des enzymes. L'objectif est donc de détruire définitivement ces enzymes afin de préserver les antioxydants et pouvoir ainsi proposer ces épidermes de pommes comme ingrédient fonctionnel, et ce quelque soit la matrice alimentaire (par exemples un jus, une compote ou un yaourt).

Pour analyser l'évolution du brunissement, les poudres de pommes réhydratées ont été caractérisées par leur couleur selon le système colorimétrique  $L^*a^*b^*$  pendant quatre jours. Le brunissement est caractérisé par l'évolution de deux paramètres : la diminution de  $L^*$  et l'augmentation de  $a^*$ . Cette méthode de caractérisation a été utilisée par les travaux de Colin-Henrion pour mettre en évidence le brunissement enzymatique sur des pommes (Colin-Henrion 2008). Une diminution de  $L^*$  traduit une réduction de la luminosité de l'échantillon, une augmentation de  $a^*$  signifie que la couleur de l'échantillon dérive vers les rouge/orangé/marron et une augmentation de  $b^*$  est caractéristique d'une évolution vers le jaune (Altunkaya 2014). Les polyphénols de la classe des flavonoïdes sont naturellement de couleur jaune, ils évoluent avec l'action des enzymes PPO et POD en composés quinones de couleur marron (Venkatachalam 2012).

Les poudres de pommes sont ajoutées à différentes matrices liquides : de l'eau distillée, un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O 50/50 et de l'éthanol pur. Chaque surnageant est analysé pour observer le comportement de la matière « broyat de pommes » dans chacun des milieux de réincorporation. Une évolution se produit très rapidement après la remise en solution des poudres de pommes *Golden*. D'après la Figure 44, l'évolution des paramètres de couleur  $L^*$  et  $a^*$  montre une diminution de  $L^*$  et une légère augmentation de  $a^*$  pour la poudre remise en 100 % d'eau distillée. La luminosité des surnageants des échantillons réhydratés en 100 % EtOH ou EtOH/H<sub>2</sub>O 50/50 n'évolue pas, alors que les valeurs de  $a^*$  augmentent. L'échantillon dans 100 % d'EtOH se démarque dès J<sub>0</sub>, avec une valeur de  $a^*$  très basse soit -7,0 et une valeur de  $b^*$  plus haute que les autres échantillons, soit 27,0.



**Figure 44:** Suivi des paramètres  $L^*$  et  $a^*$  au cours du temps et mise en évidence du brunissement enzymatique de J<sub>0</sub> et J<sub>4</sub>, ■ en milieu H<sub>2</sub>O; ■ milieu EtOH/H<sub>2</sub>O 50/50 et ■ milieu 100 % EtOH. (n = 10 écart type)



*Figure 45: Evolution des broyats de pommes dans différentes matrices liquides à J4. De gauche à droite : 100 % H<sub>2</sub>O ; H<sub>2</sub>O/EtOH 50/50 ; 100 % EtOH.*

L'interprétation des paramètres  $L^*$  et  $a^*$  est à rapprocher de l'évolution de la couleur observée à l'œil (Figure 45). Outre le surnageant qui est de couleur différente dans les 3 cas (marron dans l'essai 100 % eau ; marron clair/jaune dans H<sub>2</sub>O/EtOH 50/50 ; jaune vif pour 100 % EtOH), la couleur des broyats a également évolué. En effet, les broyats dans les milieux 100 % H<sub>2</sub>O ou EtOH/H<sub>2</sub>O 50/50 sont marrons, cela traduit une reprise très importante de l'activité des enzymes PPO et POD qui ont oxydé toute la matrice pomme et ont dégradé tous les polyphénols présents en les transformant en composés bruns, les o-quinones. A l'inverse, la matrice pomme additionnée dans 100 % EtOH est devenue blanche, avec un surnageant jaune car l'éthanol pur a permis d'extraire une grande partie des polyphénols. En effet, la couleur jaune du surnageant est typique des polyphénols de la classe des flavonoïdes. Les enzymes ne semblent pas avoir repris leur activité dans l'éthanol.

L'éthanol pur semble donc être un milieu favorable pour protéger les antioxydants. L'enzyme est toujours en contact avec les substrats polyphénoliques mais n'a pas les éléments nécessaires à son fonctionnement. En revanche, une réhydratation complète de la poudre de pommes dans 100 % d'eau distillée est critique pour les polyphénols car l'enzyme PPO se réactive immédiatement, ce qui se traduit par le brunissement de la matrice eau distillée/poudre d'épidermes de pommes. Ces résultats montrent qu'il est indispensable d'appliquer une méthode d'inactivation de la PPO et de la POD sur les échantillons de pommes avant ou après la lyophilisation. Dans le cas présenté, l'évolution des polyphénols ne dépend pas de leur affinité avec le milieu car les composés phénoliques se solubilisent aussi bien dans l'eau que dans l'éthanol. En revanche, la présence d'eau semble être un des facteurs responsables de la reprise en activité des enzymes.

## **II.2. Adjuvants naturels**

Les industries agroalimentaires protègent leurs fruits frais du brunissement par immersion des végétaux dans des bains contenant des agents antibrunissement. Ces agents sont le plus souvent des produits de synthèse comme l'acide ascorbique, l'acide citrique ou encore les sulfites (Altunkaya 2008, Kumar 2012). Ces additifs sont réglementés et leurs concentrations dans les produits finis sont limitées. Cependant, certains végétaux contiennent naturellement ces molécules

antibrunissement. Par exemple, l'acide ascorbique, appelé aussi vitamine C, est présent dans de nombreux fruits tels que les agrumes, la fraise et le kiwi. C'est un composé réducteur qui rétrograde les o-benzo-quinones en o-diphénols correspondants, composés incolores. La réaction d'oxydoréduction quinone-acide ascorbique se poursuit tant que l'acide ascorbique, l'oxygène et l'enzyme active sont présents dans le milieu.

L'efficacité de ces composés sur le brunissement a été prouvée par de nombreux travaux. L'action temporaire de l'acide ascorbique est du type réducteur et n'inhibe pas directement la PPO (Altunkaya 2014). Lors d'une oxydation enzymatique, l'acide ascorbique réduit les o-quinones formées par l'enzyme en diphénol initial ce qui limite le brunissement par un mécanisme dit de "réaction de désactivation". L'acide citrique a un effet inhibiteur indirect sur la PPO. L'acide citrique exerce un double rôle inhibiteur par abaissement du pH et par chélation du cuivre.

L'intérêt d'utiliser ces agents est qu'il ne soit pas nécessaire d'appliquer un traitement thermique (blanchiment), étape critique supplémentaire pour les antioxydants (composés thermosensibles). L'utilisation de substances naturelles serait un atout dans l'industrie agroalimentaire et permettrait de valoriser les coproduits végétaux de ces fruits (citrons, fraises...) pour leur capacité à inactiver naturellement les enzymes responsables du brunissement. Plusieurs auteurs s'intéressent de plus en plus aux agents antibrunissements dits naturels à partir de végétaux et sur des végétaux (Zocca 2011, Park 2013).

### **II.2.1. Ajout de poudre de fraises**

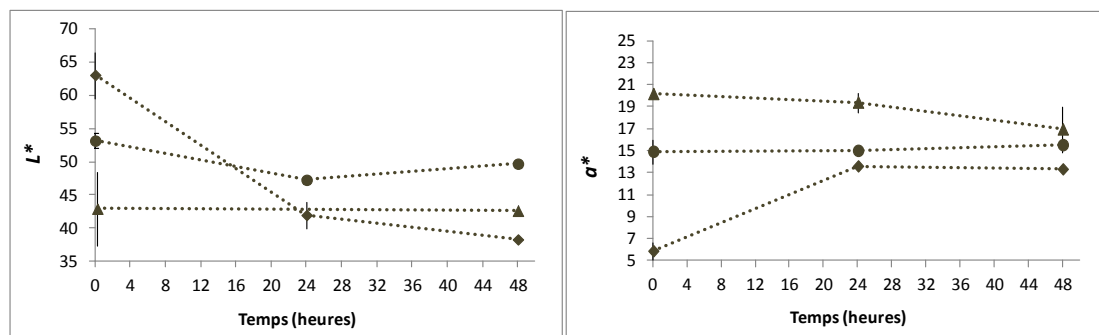
La fraise est un fruit connu pour être très riche en acide ascorbique (67 mg/100 g poids frais, *source ANSES*), un composé ayant un rôle dans la réduction des quinones (responsables de la couleur brune) en composés incolores. La poudre de fraises utilisée est une poudre commercialisée par la société Fruitis (Estillac, France).

Les poudres de pommes et de fraises sont mélangées et remises en eau. Le suivi de la couleur  $L^*a^*b^*$  est réalisé sur trois jours.

D'après les résultats de la Figure 46, pour la poudre de pommes témoin, le paramètre  $L^*$  diminue durant les premières 24 heures et la réduction se poursuit jusqu'à 48 heures. En parallèle, l'augmentation du paramètre  $a^*$  est visible jusqu'à 24 heures pour la poudre de pommes témoin mais est stable de 24 à 48 heures. Le brunissement s'opère rapidement dès 24 heures, où la totalité de la matrice est brune. La valeur de  $L^*$  diminue légèrement pour la poudre de fraises, alors que celle du mélange de poudres pommes et fraises n'évolue pas. Nous observons une légère variation pour le paramètre  $a^*$  de 0 à 48 heures, en revanche aucune variation pour le mélange de poudres pommes et fraises. Les antioxydants de la fraise, comme la vitamine C, semblent avoir inactivé les

enzymes de la pomme et limité le brunissement. De ce fait, la poudre de fraises semble jouer son rôle d'antibrunissement vis-à-vis des épidermes lyophilisés de pommes *Golden*.

L'hypothèse pour comprendre ce maintien de la couleur initiale serait que les antioxydants des pommes et des fraises ont un effet synergique de protection contre les oxydases et les peroxydases. Ainsi la vitamine C et les autres antioxydants présents dans la fraise pourraient réduire les composés bruns de la pomme en composés incolores.



**Figure 46:** Suivi sur 48 heures des paramètres  $L^*$  et  $a^*$  d'un mélange de poudres de pommes + fraises remises en eau.  $\diamond$  Poudre de pommes témoin;  $\blacktriangle$  poudre de fraises témoin et  $\bullet$  poudre de pommes + fraises. ( $n = 10$ , écart type)

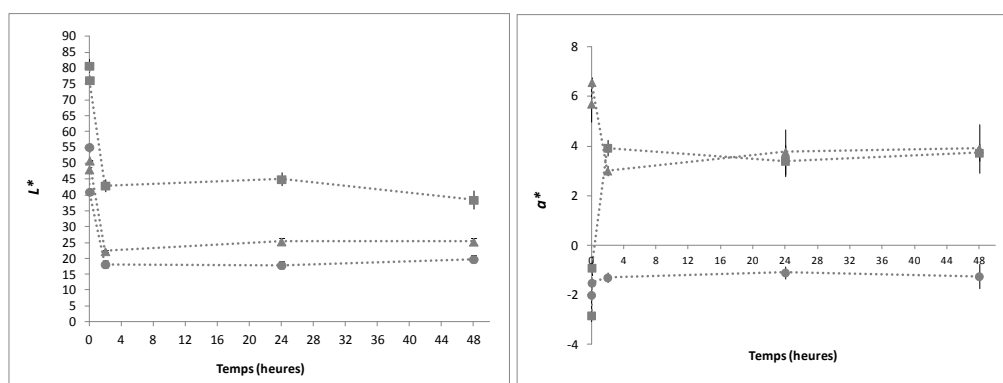
Cet essai montre qu'il est possible de remplacer de l'acide ascorbique pur par une poudre d'un fruit naturellement riche en ce composé. Cependant, la poudre de fraises contient beaucoup d'autres composés que les antioxydants. La composition en sucres et en pectines, ainsi que la couleur rouge de la fraise peuvent être des facteurs indésirables pour l'industrie agroalimentaire car les propriétés physicochimiques, le goût et la couleur du produit fini en seront alors modifiées.

### II.2.2. Ajout de jus de fruits

Les jus de fruits et les végétaux dont ils sont issus, restent riches en molécules antioxydantes. De ce fait, il serait également intéressant d'observer si les concentrations en antioxydant dans ces jus sont suffisantes pour contrer les réactions des enzymes PPO et POD. Les jus testés sont à base de citrons et de fraises. La fraise contient de l'acide ascorbique comme précisé dans le paragraphe précédent. Le jus de citron est composé d'acide ascorbique et d'acide citrique. S'il est ajouté en quantité suffisante dans le milieu, l'acidité pourrait atteindre un pH inférieur à 3 et permettrait d'inactiver l'enzyme. De plus, l'acide citrique est un chélateur efficace qui inhibe les enzymes responsables du brunissement en réduisant la disponibilité du cuivre sur le site actif de la PPO, tout en étant également un acidifiant (Melo 2014).

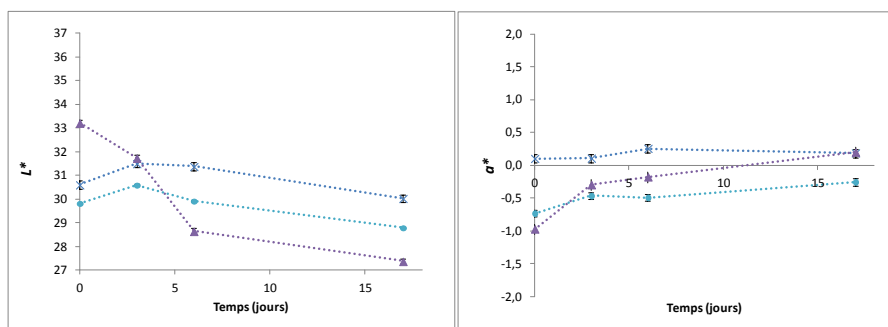
Les poudres de pommes additionnées de jus de fraises ou de jus de citrons sont caractérisées par leur couleur sur trois jours selon le système colorimétrique CIELab. Les résultats présentés sur

la Figure 47, mettent en évidence une stabilité de la couleur des deux mélanges de jus de fruits. Le jus de pommes témoin évolue de 0 à 48 heures vers un brunissement car nous observons une diminution du paramètre  $L^*$  et une augmentation du paramètre  $a^*$ . En revanche, un brunissement n'est pas présent dans le mélange de poudre de pommes et de jus de fraises, malgré une réduction de la valeur de  $L^*$ , mais aucune évolution de  $a^*$ . Les mêmes résultats sont retrouvés pour le mélange de pommes, de fraises et de citrons. Les pH de ces deux derniers échantillons sont inférieurs à celui du témoin, soit respectivement pH = 3,49 et pH = 3,2 pour le mélange pommes/fraises et pommes/fraises/citrons. Les mesures de couleur à 3 min après ajout des jus montrent que l'évolution de la couleur se fait très rapidement après remise en solution aqueuse.



**Figure 47:** Suivi sur 48 heures des paramètres  $L^*$  et  $a^*$  d'un mélange de poudre de pommes et de jus de fraises ▲ (pH 3,49); jus de pommes témoin ■ (pH 3,74) ; jus de pommes + fraises + citrons ● (pH 3,2). ( $n = 10$ , écart type)

Dans un second temps, les profils de couleurs obtenus pour des mélanges de pomme/citron sont comparés à un profil d'évolution de la couleur de poudre de pommes blanchies et remises en eau. D'après la Figure 48, les évolutions sont similaires entre ces deux échantillons blanchis et additionnés de jus de citron. Les enzymes semblent donc bien inactivées par le blanchiment à 80 °C pendant 20 min et par l'abaissement du pH par le jus de citron. La Figure 49 confirme bien le fait que l'échantillon avec le jus de citron ne brunit pas alors que l'échantillon témoin réhydraté de poudre de pommes devient marron assez rapidement (Photo prise à 48 h). Ces résultats obtenus à partir de nos échantillons de pommes *Golden* confirment l'action des différents traitements sur la PPO et POD rapportée par les auteurs cités précédemment.



**Figure 48 :** Evolution des paramètres de couleur  $L^*$  et  $a^*$  pour  $\times$  des poudres réhydratées d'épidermes de pommes blanchis,  $\blacktriangle$  des poudres d'épiderme bio témoin et  $\bullet$  des épidermes bio réhydratés et additionnés de jus de citron. ( $n = 10$ , écart type)



**Figure 49:** Evolution du mélange de la poudre de pommes et jus de citron après 48 h. A gauche : mélange pommes et citron ; à droite : poudre de pommes remise en eau témoin.

Les essais d'ajout de poudres ou de jus de fruits sont convainquant et offrent de nouvelles alternatives naturelles pour contrer le brunissement enzymatique des poudres de pommes. Malgré l'intérêt nutritionnel, leur réincorporation dans des matrices alimentaires peut être difficilement acceptée par le consommateur en raison du changement de leur couleur ou de la saveur. Par exemple, la fraise est de couleur rouge et le citron va amener une couleur jaune et une acidité prononcée à l'aliment. C'est pourquoi la fin de ce chapitre sera consacrée à l'étude des traitements thermiques. Le blanchiment a l'avantage de ne pas changer les propriétés organoleptiques de l'aliment mais peut dégrader les composés nutritionnels tels que les antioxydants et polyphénols.

### II.3. Traitement thermique

Le blanchiment est la technique la plus courante pour inactiver les enzymes des végétaux. Cette technique se fait généralement sur les fruits et les légumes frais. Il semblerait donc qu'il faille blanchir les pommes avant de les peler et de les réduire en poudre. Les traitements thermiques sont cependant critiques pour les composés polyphénoliques car ils favorisent leur dégradation (Aka 2013). L'objectif est donc d'étudier l'effet de différentes températures de blanchiment sur plusieurs matrices pommes, afin de déterminer la température optimale qui permet d'inactiver les enzymes tout en préservant la capacité antioxydante globale des échantillons. Des composés, autres que les polyphénols jouent également un rôle dans l'activité



antioxydante de la pomme, c'est le cas de la vitamine C. Il serait donc intéressant de préserver le pool de molécules ayant une capacité antioxydante (Suárez-Jacobo 2011).

La pomme entière et l'épiderme de pommes ont des compositions nutritionnelles différentes (Lata 2009, Karaman 2013), de ce fait, il est probable que les températures de blanchiment n'aient pas le même impact sur les deux matrices pommes.

Dans un premier temps, des tranches fraîches de pommes *Golden Delicious* de 0,5 mm d'épaisseur sont blanchies à différentes températures : 55 °C, 70 °C, 80 °C et 90 °C pendant plusieurs durées (5 min, 10 min, 15 min et 20 min). Les températures de blanchiment sont suivies grâce à des sondes placées à cœur dans les tranches de pommes, ainsi que dans l'enceinte du four. Le début du temps de traitement thermique est déclenché lorsque la température de consigne est atteinte au cœur de la tranche de pommes. Les paramètres de couleur sont mesurés directement sur les tranches de pommes à la sortie du four. Nous pouvons constater Figure 50, que le traitement quel qu'il soit joue sur la couleur initiale et plutôt sur la luminosité ( $L^*$ ) des tranches blanchies. Aucune évolution de  $a^*$  n'est visible.

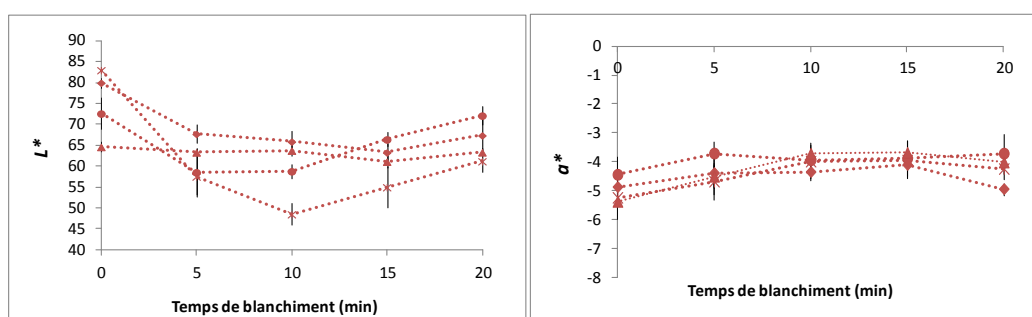
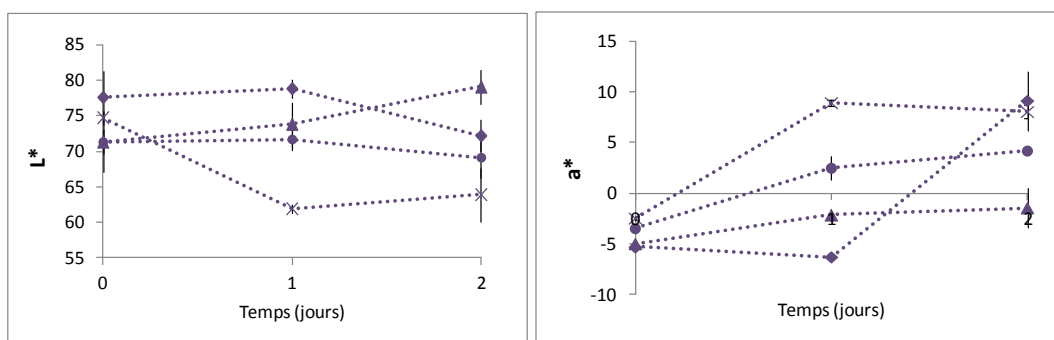


Figure 50 : Evolution des paramètres  $L^*$  et  $a^*$  de tranches de pommes blanchies à différentes températures de 0 à 20 min. 55 °C x, 70 °C ● ; 80 °C ◇ et 90 °C ▲. (n=10, écart type)

Suite au traitement thermique, une partie des échantillons est directement congelée pour être finalement lyophilisée et broyée. Les poudres de tranches de pommes blanchies à différentes températures sont remises en eau et le brunissement est suivi par colorimétrie  $L^*a^*b^*$  sur trois jours.

Les travaux de Vega-Galvez *et al.* (2011) montrent que ce n'est pas spécifiquement une température de 90 °C qui dégrade les antioxydants mais plutôt des temps de traitement thermiques longs à plus faibles températures. De ce fait, nous avons choisi d'exploiter les évolutions de couleurs pour les tranches de pommes traitées durant 5 min à 55 °C, 70 °C, 80 °C et 90 °C. D'après la Figure 51, seul le blanchiment à 5 min/90 °C est efficace pour inactiver les enzymes des tranches de pommes *Golden Delicious*. D'autres essais non représentés ici ont mis en évidence qu'un traitement de 20 min/80 °C est également efficace.

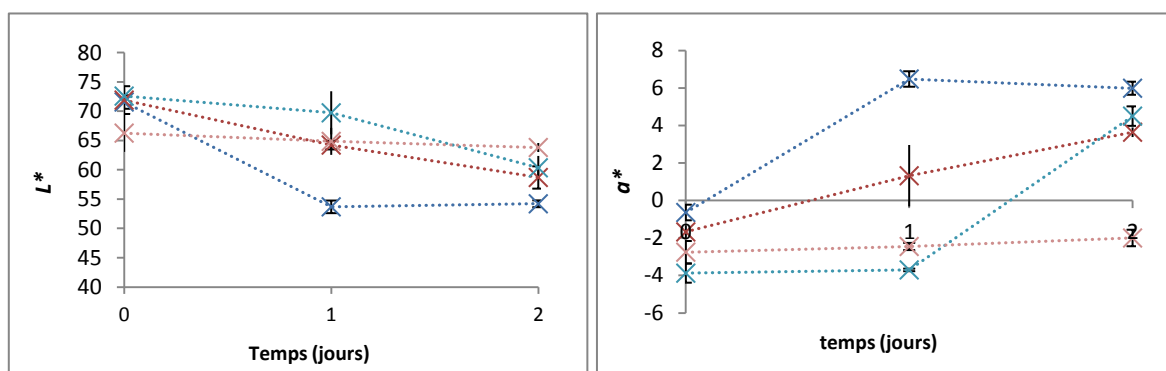




**Figure 51:** Suivi des paramètres  $L^*$  et  $a^*$  de tranches de pommes lyophilisées blanchies durant 5 min à différentes températures et remises en eau. 55 °C ×, 70 °C ● ; 80 °C ◇ et 90 °C ▲. (n=10, écart type)

Dans un second temps, ce sont les épidermes de pommes *Golden Delicious* qui ont été blanchis durant plusieurs minutes et à des températures différentes (55 °C, 70 °C, 80 °C et 90 °C). Comme pour les tranches, les traitements thermiques sont suivis par des sondes à cœur et ambiante pour s'assurer que la température de consigne est atteinte et appliquée tout au long de l'essai. Une fois les épidermes blanchis, ceux-ci sont lyophilisés, broyés et réhydratés en milieu aqueux. Le suivi de la couleur se fait également sur trois jours.

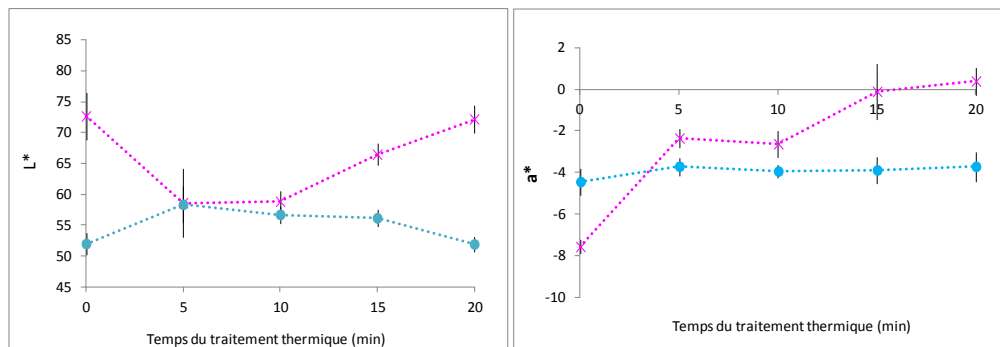
Tous les essais réalisés ont été analysés et seuls les résultats présentés Figure 52 mettent en avant une inactivation du brunissement pour les épidermes de pommes *Golden*. Ainsi, un traitement de 15 min/90 °C inactive de façon certaine les enzymes. Durant deux jours les paramètres  $L^*$  et  $a^*$  n'évoluent pas. Par rapport aux tranches de pommes, il faut donc ajouter au moins 10 min de blanchiment pour obtenir une inactivation.



**Figure 52 :** Suivi des paramètres  $L^*$  et  $a^*$  d'épidermes de pommes blanchies lyophilisées sur 2 jours et remises en eau. Epidermes blanchis pendant 15 min à 55 °C ■, 70 °C ■, 80 °C ■, et 90 °C ■. (n=10, écart type)

L'hypothèse de départ selon laquelle les températures de blanchiment nécessaires à l'inactivation des enzymes pourraient être différentes sur les deux échantillons est correcte. En

effet, la température de blanchiment de l'épiderme de pommes doit être supérieure à celle de la tranche de pomme. Cette différence s'explique par la composition de chacune des deux matrices. L'aspect visuel du parenchyme montre une structure plus fragile et plus poreuse, alors que l'épiderme est une barrière naturelle aux agressions extérieures du fruit, donc plus solide. Le temps de blanchiment pour inactiver l'enzyme est plus long car les parois végétales sont plus épaisses, donc il faut plus de temps à la chaleur pour atteindre l'enzyme et l'inactiver. En revanche, 90 °C est une température de cuisson et non de blanchiment. Il est donc important de réduire la température et augmenter légèrement le temps de traitement, tel que 80 °C pendant 20 minutes. Ce couplage temps/température est également efficace dans l'inactivation de la PPO et POD et ne modifie pas la couleur des épidermes par rapports aux épidermes initiaux non traités thermiquement (Figure 53).



**Figure 53 :** Evolution des paramètres  $L^*$  et  $a^*$  d'échantillons de pommes blanchies à différentes températures. Epidermes témoins x, épidermes blanchis à 80 °C •. (n=10, écart type)

### **III. Conclusions sur l'incidence des prétraitements sur la préservation des antioxydants**

La lyophilisation, le broyage ou même le blanchiment ne sont pas de simples étapes de préparation des végétaux mais ce sont de réelles étapes de transformation qu'il faut maîtriser si l'on souhaite valoriser des coproduits en relation avec leur contenu en molécules d'intérêt (polyphénols par exemple) et leur capacité antioxydante.

D'un point de vue purement pratique, il nous fallait disposer d'une matière première tout au long des trois années de thèse, donc transformer la pomme, fruit volumineux, riche en eau, brunissant, en une matière première stable et moins encombrante. Sans être originaux, les essais présentés dans ce chapitre ont permis d'évaluer les conditions de conservation de nos pommes, en s'assurant notamment que la lyophilisation préserve la quantité des polyphénols et le pouvoir antioxydant. La préservation des propriétés de ces poudres broyées et lyophilisées lorsqu'elles sont mises en contact avec une phase aqueuse, caractérisées par un suivi colorimétrique du brunissement, n'est possible que si la poudre subit un prétraitement thermique ou si des agents antibrunissement naturels sont ajoutés, sous la forme de poudre de fraise ou jus de citron, ce qui dans une perspective "marché/consommateurs" permettrait de conserver une connotation de naturalité de l'ingrédient.



## *II.*

### *Valorisation des coproduits végétaux en tant qu'agent émulsifiant*

---

Cette deuxième partie s'intéresse à une nouvelle voie de valorisation fonctionnelle des épidermes de pommes en les utilisant en tant que tensioactif pour stabiliser des émulsions. L'objectif plus général de l'utilisation de particules solides dans les émulsions est de remplacer les tensioactifs chimiques par des composés naturels. Deux matrices ont été testées, l'épiderme de pommes qui est une matrice hydrophile et la poudre délipidée de cacao qui a plutôt un caractère amphiphile. Plusieurs paramètres ont été étudiés pour optimiser l'émulsification.

La maîtrise des additifs alimentaires par l'industrie agroalimentaire a révolutionné les modes de vie et les comportements alimentaires des consommateurs de ces dernières décennies. Ces additifs permettent notamment de consommer toutes les familles d'aliments au jour le jour, d'améliorer la conservation des produits et de proposer de larges gammes de textures (mayonnaises, crèmes, mousses, sauces, crèmes glacées...).

Ces additifs alimentaires sont pour beaucoup des agents « tensioactifs » ou « émulsifiants » réglementés par la directive européenne 95/2/EC. Ces agents tensioactifs sont des molécules qui présentent un caractère amphiphile qui leur permet de favoriser la formation de produits d'apparence homogène à partir de phases intrinsèquement non miscibles telles que l'huile et l'eau et qui permettent de formuler des produits aux textures diverses et variées.

Les produits émulsionnés tels que les mayonnaises ou autres sauces sont des exemples concrets de formulations dans lesquelles des émulsifiants sont utilisés pour finement disperser de l'huile dans de l'eau ou inversement et ainsi donner des produits homogènes avec des dates limites d'utilisation optimale (DLUO) de plusieurs mois ou de plusieurs années.

De nombreux émulsifiants utilisés par l'industrie agroalimentaire sont obtenus par transformations chimiques d'ingrédients naturels. A titre d'exemple, les esters de sucre référencés dans le secteur agroalimentaire sous le code E473 sont produits par réaction catalytique d'estérification entre du sucre et des dérivés d'acides gras en présence d'un large excès de solvant. Compte tenu de l'évolution des modes de consommation de ces dernières années, les consommateurs sont de plus en plus exposés aux additifs alimentaires naturels ou de synthèse. Sur la base de ce constat, la Commission Européenne a élaboré en 2001 un rapport sur la consommation des additifs alimentaires dans l'Union européenne qui révèle que la dose journalière admissible (DJA), en deçà de laquelle aucun effet nocif pour la santé n'est établi, est dépassée pour plusieurs dizaines d'additifs. L'Union Européenne a donc entrepris en 2011 de réévaluer et de remettre à jour la totalité des additifs alimentaires autorisés dans les vingt-sept pays européens afin d'écarter ceux qui pourraient avoir un effet néfaste sur les consommateurs. A cette réévaluation s'ajoutent des tendances de consommation plus récentes qui viennent aussi ralentir l'utilisation des additifs alimentaires. Le développement croissant des marchés de l'alimentation Bio et/ou végétarienne/végétalienne contribue à cette diminution en favorisant la naturalité et l'origine végétale des produits alimentaires plutôt que l'utilisation de molécules de synthèse.

Sur la base de ce constat, il est intéressant de suggérer des alternatives à certains additifs alimentaires et ainsi de proposer des auxiliaires de formulation qui soient 100 % végétaux et qui garantissent l'innocuité des produits finaux sur les consommateurs.

Notre démarche vise donc à développer des agents émulsifiants, 100 % naturels et originaux en valorisant des coproduits agronomiques ou agroalimentaires. La bioraffinerie mise en œuvre devra être aussi simple que possible afin de faciliter le transfert à l'échelle industrielle et de valoriser la plus grande fraction possible de coproduits.

Lors de nos expériences, aucun émulsifiant ne sera utilisé en dehors des poudres végétales. La stabilisation des émulsions pourra avoir dans ce cas différentes origines:

- l'adoption des particules solides aux interfaces (émulsions de Pickering) issues principalement des parois végétales (Pickering 1907),
- la présence d'émulsifiants endogènes (exemple : les protéines),
- le piégeage des gouttes d'huile dans le réseau de particules solides.

Deux coproduits végétaux seront testés pour les essais d'émulsification: la poudre de pommes et la poudre de cacao délipidée. Dans les deux cas, nous évaluerons la taille moyenne  $D$ , des gouttes formées selon un protocole d'émulsification standard (agitation turbulente à l'aide d'un agitateur de type Ultra-turrax® à 17 500 rpm : l'huile est réincorporée progressivement dans la phase aqueuse) et son évolution cinétique pendant environ 1 mois. La taille moyenne des gouttes est obtenue à partir d'observations au microscope optique (cas de la pomme) ou de mesures au granulomètre laser (cas du cacao). L'huile adoptée est le miglyol et sa fraction massique est de 20 % (sauf indication contraire).

## **I. Emulsions à base de poudre de pomme**

Le protocole suivant est appliqué pour la préparation des poudres:

- Réception des pommes entières pommes *Golden Delicious*,
- Epluchage des pommes à la main à température ambiante et congélation durant 24 heures,
- Lyophilisation,
- Broyage 2 x 30 secondes au moulin à café,
- Centrifugation 2 min à 10 000 rpm,
- Séchage en étuve à 50 °C pendant 24 heures.

### **I.1. Emulsions à base de broyat de pomme entière et influence de l'extrait sec total**

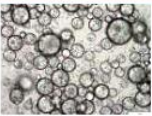
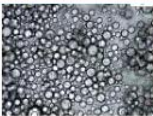
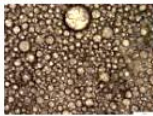



Les expériences seront réalisées dans certains cas, avec du broyat frais et dans d'autres cas avec de la poudre de pommes lyophilisées. Afin de comparer les échantillons, la teneur en matériel végétal sera exprimée en termes d'extrait sec.

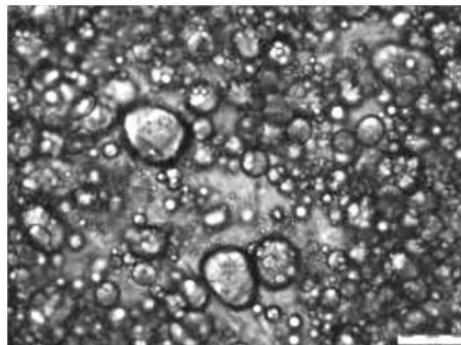
Pour cela, la quantité d'extrait sec a d'abord été déterminée dans un broyat frais en le laissant sécher à l'étuve durant 24 h à 45 °C. Le pourcentage d'extrait sec d'un broyat frais est de 20 %.

Ensuite, une gamme dont la phase aqueuse contient de 5 % à 100 % de broyats de pommes soit de 1 % à 20 % d'extrait sec a été utilisée pour réaliser une série d'émulsions et observer l'évolution de la taille moyenne des gouttes.

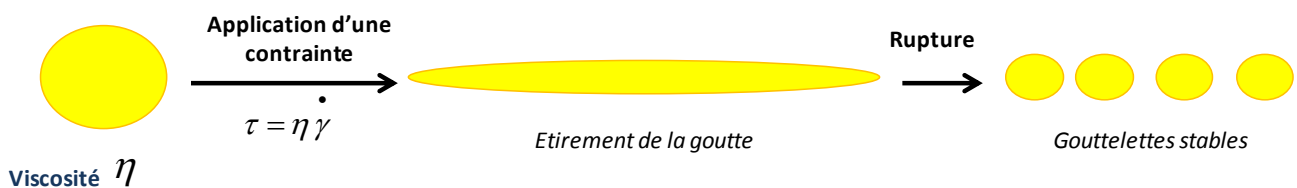
Les résultats sont présentés dans le Tableau 15.

**Tableau 15:** Variation du pourcentage d'incorporation d'extrait sec dans une émulsion et impact sur la taille des gouttelettes d'huile. La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ . Le pourcentage d'extrait sec est exprimé par rapport à la phase aqueuse.

% broyat	5	10	20	50	75	100
Miglyol (20%)	2g	2g	2g	2g	2g	2g
Masse de broyat de pommes	0,4g	0,8g	1,6g	4g	6g	8g
Eau	7,6g	7,2g	6,4g	4g	2g	0g
<b>% extrait sec</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
Observation microscope						
Diamètre des gouttelettes	$\approx 58 \mu\text{m}$	$\approx 29 \mu\text{m}$	$\approx 27 \mu\text{m}$	$\approx 20 \mu\text{m}$	$\approx 13 \mu\text{m}$	$\approx 7 \mu\text{m}$

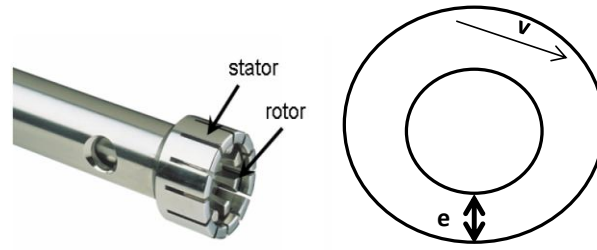


**Figure 54 :** Image de microscopie optique d'une émulsion à 20 % d'extrait sec de pomme dans la phase aqueuse. La barre d'échelle représente 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure 55 :** Principe d'émulsification.





*Figure 56 : Gradient de cisaillement.*

*e : entrefer entre le rotor et le stator ; v : vitesse circonférentielle.*

Il apparaît clairement que plus le pourcentage d'extrait sec est important, plus l'émulsion est fine. Il n'est pas possible à ce stade de déterminer de façon certaine le mode de stabilisation des émulsions. L'image de la Figure 54 obtenue à un plus fort grossissement révèle que certaines gouttes adoptent une forme non sphérique, révélatrice d'un comportement « rigide » des interfaces. Ce type de comportement est généralement observé dans les émulsions de Pickering lorsque les particules adsorbées sont soumises à des interactions attractives fortes (Arditty 2007). Il est donc vraisemblable que des particules amphiphiles issues du matériel de pomme soient adsorbées aux interfaces. L'augmentation de l'extrait sec rend plus probable l'adsorption des particules et augmente la viscosité de la phase aqueuse. Les deux facteurs tendent de façon concomitante à réduire la taille des gouttes comme cela est observé sur le Tableau 15.

La stabilité des émulsions est dépendante du cisaillement appliqué sur les gouttes d'huile (Figures 55 et 56). Lorsqu'une contrainte est appliquée sur une goutte d'huile dans un milieu de viscosité  $\eta$ , celle-ci s'étire puis se rompt en plusieurs goutelettes d'huile plus petites et plus stables. La contrainte appliquée est définie comme étant :

$$\tau = \eta \dot{\gamma}$$

où  $\tau$  est la contrainte de cisaillement ;  $\dot{\gamma}$  : le gradient de cisaillement qui est lui-même défini

comme étant :  $\dot{\gamma} \approx \frac{v}{e}$ .

où  $v$  est la vitesse circonférentielle de l'ultraturrax et  $e$ , l'entrefer entre le rotor et le stator.

A vitesse constante d'homogénéisation avec l'ultraturrax, donc avec un gradient de cisaillement constant, la viscosité du milieu  $\eta$  ne dépend que de la contrainte appliquée. De ce fait plus, la contrainte appliquée va être forte, plus les goutelettes d'huile vont être petites. La viscosité de la phase aqueuse est corrélée au diamètre moyen des gouttes. Finalement, la stabilité du milieu est

possible grâce à l'augmentation de la viscosité de ce milieu et un diamètre moyen des gouttes d'huile plus petit.

Les émulsions obtenues ont été conservées à 4 °C pendant 1 mois (en présence d'un agent antibactérien, l'azide de sodium à 0,02 % pour éviter toute prolifération). Les émulsions dont l'extrait sec dans la phase aqueuse est inférieur ou égal à 10 % subissent un crémage (concentration des gouttes au sommet du récipient) d'autant plus marqué que l'extrait sec est faible. A 1 % et 2 % d'extrait sec, une couche d'huile macroscopique finit même par se former, traduisant un déficit de stabilité à ces faibles teneurs en matériel végétal. En revanche, aucune évolution significative n'a été observée pour les émulsions formulées avec 15 % et 20 % d'extrait tant au niveau de la taille moyenne des gouttes que de l'apparence macroscopique des échantillons. Il est également à noter que dans la plupart des émulsions obtenues les gouttes sont fortement agrégées. Il semble donc que cet état d'agrégation résulte du pontage des gouttes par des fragments solides.

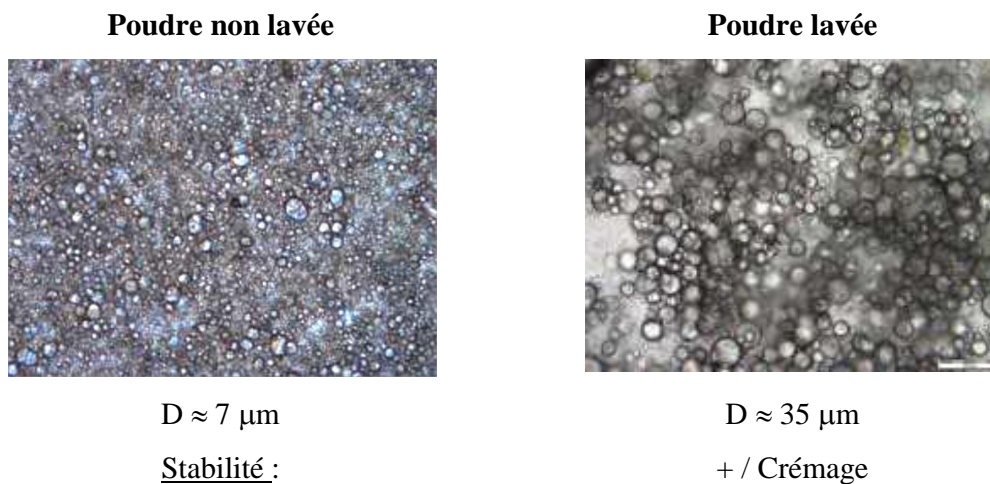
## **I.2. Tests d'émulsification sur diverses fractions de pommes**

Le protocole d'émulsification a été appliqué à différentes fractions de pommes, de la pomme entière aux différentes parties qui la constituent, et les émulsions qui en résultent ont été comparées. Le but de cette série d'expériences est d'identifier les composés et/ou les parties de la pomme responsables des propriétés émulsifiantes. Ainsi, la pomme entière lyophilisée lavée ou non lavée, dépectinisée, décirée, le parenchyme, l'épiderme ainsi que des résidus traités par CO<sub>2</sub> supercritique ont été testés.

### **I.2.1. Influence du lavage sur la pomme entière *Golden Delicious***

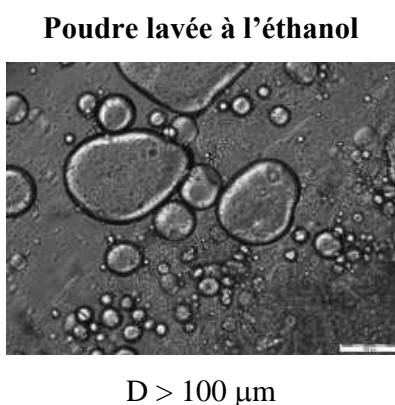
Les lavages ont pour objectif d'éliminer les composés hydrosolubles de la poudre : les sucres, les pectines, les polyphénols, les protéines ... La poudre de pomme entière *Golden* lyophilisée est dispersée dans l'eau milli-Q, puis centrifugée. Le sédiment est récupéré et séché en étuve à 45 °C pendant 24 h. L'opération est répétée 3 fois. La poudre finale est dispersée à 20 % massique dans l'eau avant de réaliser le test d'émulsification. Sur la Figure 57, nous comparons les émulsions issues des poudres lavées et non lavées. Le diamètre moyen de l'émulsion issue de la poudre lavée ( $\approx 35 \mu\text{m}$ ) est significativement plus grand que celui de l'émulsion issue de la poudre non lavée ( $\approx 7 \mu\text{m}$ ). L'élimination des composés amphiphiles comme les protéines ou les cires, a entraîné moins d'ancrage des particules de pomme sur les gouttes d'huile et donc des gouttes d'huile plus grosse. De la même façon, l'élimination des composés hydrosolubles comme

les sucres ou les pectines, a rendu le milieu moins visqueux et donc moins stable. Nous en concluons que des éléments hydrosolubles et amphipiles contribuent de façon non négligeable au caractère émulsionnant de la poudre de pomme entière.



*Figure 57 : Comparaison des émulsions issues d'une poudre de pomme entière lavée à l'eau et non lavée. L'extrait sec dans la phase aqueuse est de 20 % massique. La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ .*

La poudre a été traitée de façon analogue à l'éthanol et l'émulsion obtenue est cette fois très grossière, avec un diamètre de gouttes supérieur à 100  $\mu\text{m}$  (Figure 58). L'éthanol est susceptible d'entraîner d'autres éléments tels que les polyphénols qui pourraient jouer un rôle important dans le processus d'émulsification.

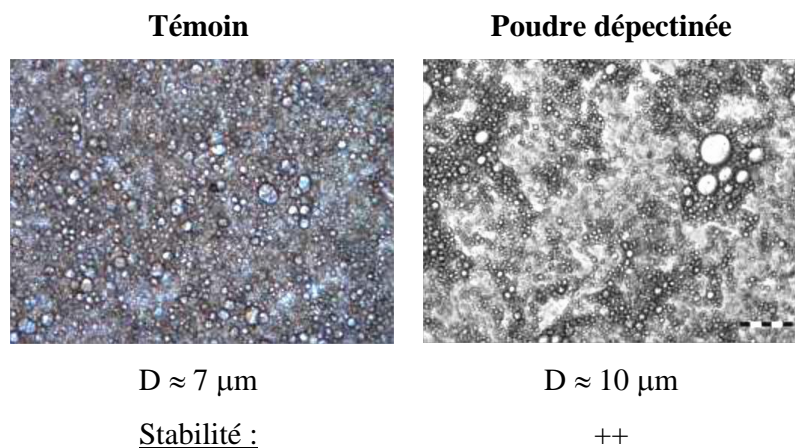


*Figure 58 : Emulsion issue d'une poudre de pomme entière lavée à l'éthanol. L'extrait sec dans la phase aqueuse est de 20 % massique. La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$ .*

### I.2.2. Influence de la dépectination sur la pomme entière *Golden Delicious*

Les pectines sont des polysaccharides qui peuvent jouer un rôle dans l'émulsification, ainsi que l'ont mis en évidence Kermani *et al.* (2015) avec des pectines d'épidermes de mangue. De ce fait, nous avons souhaité évaluer leur contribution en procédant à une dépectination de la poudre de pomme entière *Golden* en ajoutant 0,007 % de pectinases Fructoenzym<sup>®</sup> Press (Erbsloh) au broyat de pommes fraîches, dans un bain marie à 30 °C pendant 60 minutes.

Sur la Figure 59, il est possible de comparer l'émulsion témoin et l'émulsion dépectinée. Cette dernière reste fine et stable, même si la distribution comporte une fraction de gouttes de taille plus élevée. Cette expérience montre donc que la dépectination n'a pas une influence significative sur le pouvoir émulsionnant de la poudre de pomme entière compte tenu de la faible aptitude des pectines à s'adsorber aux interfaces.



*Figure 59 : Comparaison des émulsions issues d'une poudre de pomme entière standard et une poudre dépectinée. L'extrait sec dans la phase aqueuse est de 20 % massique. La barre d'échelle représente 100  $\mu$ m.*

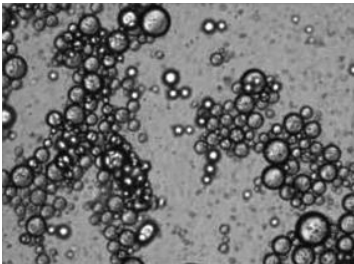

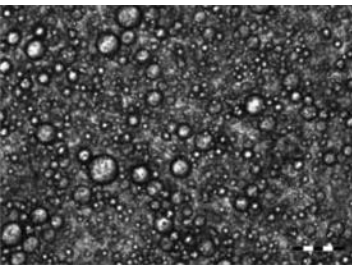
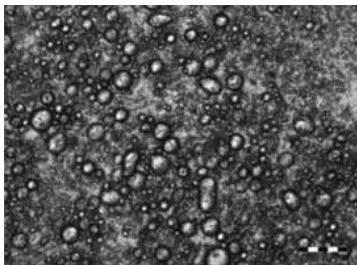
### I.2.3. Comparaison du pouvoir émulsionnant du jus, du parenchyme et de l'épiderme

Nous étudions à présent l'aptitude à l'émulsification des composantes de la pomme entière : le parenchyme, l'épiderme et le jus de pomme. Ce dernier contient principalement les composés hydrosolubles de la pomme. Les composés solides comme les parois végétales ne sont pas présents dans le jus de pomme mais se retrouvent en revanche dans le matériel issu du parenchyme et de l'épiderme. La comparaison des résultats pourrait permettre de savoir si les parois végétales possèdent ou non des propriétés émulsifiantes.

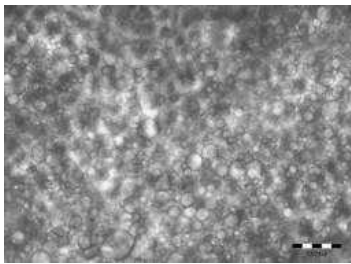
Les images microscopiques des émulsions issues des différentes fractions sont reportées sur la Figure 60.

Les émulsions fabriquées dans le jus de pomme ont un diamètre moyen initial de l'ordre 25  $\mu\text{m}$ . Quelques minutes après leur fabrication, les gouttes ont tendance à former une crème et une couche d'huile macroscopique se forme après seulement quelques heures. Ainsi, en l'absence de particules solides (notamment les fragments de parois végétales), les émulsions sont instables.

Le parenchyme de pommes *Golden* est récupéré après épluchage de la pomme entière, lyophilisation et broyage. Les émulsions en résultant sont similaires aux pommes entières à la fois en termes de diamètre moyen (5  $\mu\text{m}$ ) et de stabilité (pas d'évolution à l'échelle d'un mois à 4 °C). Le même protocole a été appliqué sur les épidermes lyophilisés. L'émulsion obtenue à partir d'épiderme de pomme *Golden* est légèrement plus grossière que l'émulsion témoin à base de pomme entière avec un diamètre moyen proche de 15  $\mu\text{m}$ . Aucune évolution significative n'a été notée à l'échelle d'un mois à 4 °C. Afin de généraliser les résultats, des essais complémentaires ont été réalisés avec l'épiderme d'une variété de pomme différente : la *Red Delicious*. Les résultats sont tout à fait comparables à ceux de la pomme *Golden*. La variété *Red Delicious* est riche en cires à la surface du fruit. Afin d'évaluer l'impact des cires sur l'aptitude à l'émulsification, les épidermes de pommes ont été décirés par lavage à l'eau chaude et savon, puis les pommes ont été rincées avec du méthanol. L'émulsion obtenue a des caractéristiques identiques à celle de l'échantillon non déciré. Les cires n'ont donc aucune influence apparente sur les propriétés d'émulsification de l'épiderme de pomme.

Jus de pomme frais <i>Golden Delicious</i>	Parenchyme lyophilisé <i>Golden Delicious</i>
	
D $\approx$ 25 $\mu\text{m}$	D $\approx$ 5 $\mu\text{m}$
Epiderme lyophilisé <i>Golden Delicious</i>	Epiderme lyophilisé <i>Red Delicious</i>
	
D $\approx$ 15 $\mu\text{m}$	D $\approx$ 20 $\mu\text{m}$



<b>Epiderme déciré et lyophilisé Red Delicious</b>	
 <p>D ≈ 20 μm</p>	

*Figure 60 : Emulsions issues de différentes fractions de pommes. L'extrait sec dans la phase aqueuse est de 20 % massique. La barre d'échelle correspond à 100 μm.*

#### **I.2.4. Comportement en émulsion de poudres de pommes extraites par CO<sub>2</sub> supercritique**

##### **a/ Impact du temps de contact de la matrice pomme avec le fluide extractant CO<sub>2</sub>+EtOH supercritique**

L'extraction par CO<sub>2</sub>+EtOH supercritiques permet d'extraire un pool d'antioxydants et de polyphénols dans des fractions éthanoliques. A l'issue des extractions, il reste dans le réacteur les épidermes lyophilisés de pommes appauvris en antioxydants et autres molécules polaires. Ce résidu sous forme de poudre (environ 2 % d'eau) est récupéré et testé en tant qu'émulsifiant, pour éventuellement le valoriser en tant qu'agent de charge dans les yaourts par exemple.

Le travail a été effectué sur trois échantillons d'épidermes de pomme *Golden* dont le fluide (CO<sub>2</sub>+EtOH supercritiques) est au contact de la matrice pomme dans le réacteur isolé, durant des temps variables. Ces périodes dites statiques ont été mises en place pour laisser le temps aux polyphénols et à la matière soluble de diffuser de la matrice pomme vers le fluide extractant.

Les résidus utilisés pour les émulsions sont les suivants :

- Résidu FSC 7: issu de EFS 7 avec 4 périodes statique de 30 minutes chacune (132 min de statique au total) + 6 collectes de fraction (163 min de collecte au total) ; soit 295 min d'extraction au total.

- Résidu FSC 8 : issu de EFS 8 avec 3 périodes statique de 60 minutes chacune (190 min de statiques au total) + 5 fractions collectées (149 min de collecte au total) ; soit 339 min d'extraction.

- Résidu FSC 9: l'extraction EFS 9 s'est faite en mode dynamique, avec une seule période statique de 16 min + 10 collectes de fraction (255 min de collecte au total) ; soit 271 min au total.

Les trois extractions ont été faites avec le même solvant d'extraction : 70/28,8/2,8 CO<sub>2</sub>/EtOH/H<sub>2</sub>O à 50 °C et 25 MPa. Le réacteur est chargé avec 30 g de matière première en moyenne. Les résidus contiennent encore des antioxydants mais en quantité variable selon le temps de macération car nous supposons que plus le temps de la période statique va être long, plus les molécules auront le temps de diffuser. Chaque échantillon a été préparé selon le même protocole d'émulsification que précédemment.

Les résidus possèdent des propriétés émulsionnantes satisfaisantes mais nous remarquons que plus le temps de contact CO<sub>2</sub>/résidu est long, plus l'émulsion devient grossière (Figure 61). Ce comportement devrait trouver son origine dans l'effet du CO<sub>2</sub> sur la solubilisation plus ou moins importante de composés et/ou sur la modification de composés non extractibles (diminution de la quantité de polyphénols, des sucres dans les résidus, précipitation par l'alcool du milieu extractant...), effets qui peuvent alors moduler le caractère amphiphile de la poudre. Ce résultat est en mettre en parallèle avec le résultat de la section 1.2.1 où le lavage de la poudre à l'éthanol a vraisemblablement éliminé les tanins et une grande partie du matériel polyphénolique, engendrant une perte du pouvoir émulsionnant.

**Résidu sans période  
statique**



$D \approx 8 \mu\text{m}$

**Résidu avec période  
statique de 30 minutes**



$D \approx 12 \mu\text{m}$

**Résidu avec période  
statique de 60 minutes**



$D \approx 25 \mu\text{m}$

*Figure 61 : Emulsions obtenues avec les résidus des extractions par fluides supercritiques. L'extrait sec dans la phase aqueuse est de 20 % massique. La barre d'échelle correspond à 100  $\mu\text{m}$ .*

**b/ Autres conditions d'extraction**

*Tableau 16 : Paramètres des EFS dont les résidus testés sont issus.*

*%mol : pourcentage molaire*

EFS	Charge	T°	Composition %mol
<b>EFS 11</b>	30 g	50°C	74,4 : 20 : 2,7
<b>EFS 12</b>	15 g	50°C	75:22:03
<b>EFS 25-Bio</b>	29,6 g	24°C	00 : 96 : 04
<b>EFS 29</b>	30,8 g	50°C	87,7 : 10,8 : 1,5

Les résidus FSC sélectionnés ont été obtenus avec des paramètres d'extraction différents tels que la masse de la matière première, le type de matrices pommes (issues de l'agriculture conventionnelle ou biologique) et la composition du fluide extractant (Tableau 16). Chacune des conditions a permis de libérer des molécules diverses, plus ou moins de polyphénols et de composés solubles selon leur degré de solubilité dans le mélange  $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$  ou l'éthanol à 96 %. Les résidus secs ont été réincorporés à 5 % massique dans la phase aqueuse, la taille des particules des poudres étant inférieure à 200  $\mu\text{m}$ . Les émulsions sont obtenues par addition d'huile (miglyol) selon les mêmes conditions opératoires que précédemment.

Compte tenu de la texture des émulsions obtenues, l'observation macroscopique a été privilégiée. Dans un premier temps, les émulsions sont peu visqueuses et ne semblent pas crêmer ou sédimenter immédiatement (Figure 62 à J0). En revanche, nous observons après quelques jours de stockage une prise en masse de l'émulsion pour les échantillons EFS 11, EFS 25 et EFS 29, sous forme d'un gel, qui évolue peu au cours du temps (Figure 62 à J6). Seul EFS 12 n'a pas réellement gélifié et EFS 11 s'est rétracté et a rendu de l'eau pendant le stockage (Figure 63).



Afin d'évaluer l'impact de l'huile, une phase aqueuse à 5 % massique de poudre EFS 11 seule a été préparée (Figure 64). En 12 h, la dispersion a décanté et la partie inférieure de l'échantillon a gélifié. La gélification se fait donc assez rapidement au niveau du sédiment. La présence d'huile dans l'émulsion permet donc de garantir une répartition homogène de la poudre au moins le temps que la gélification se produise. Il semblerait donc que le résidu pomme permette la formation d'un maillage de fibres autour des gouttelettes d'huile formant un ensemble stable et épaississant. Les inclusions huileuses sous forme de gouttes dont la densité est inférieure à celle de l'eau permet d'éviter la sédimentation du gel de particules végétales solides plus denses que l'eau.

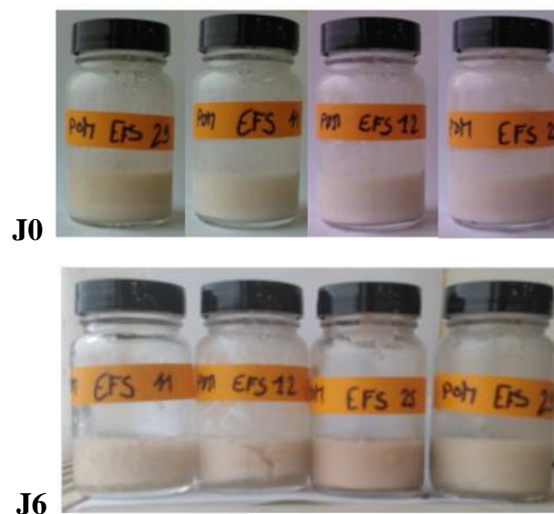


Figure 62 : Evolution des échantillons EFS 11, EFS 12, EFS 25 et EFS 29 de J0 à J6.



Figure 63 : Evolution de l'échantillon EFS 11 à J10.



Figure 64 : Phase aqueuse contenant 5 % massique de poudre EFS 11 à J1.

### I.2.5. Comportement en émulsion de poudres d'épidermes blanchies et non blanchies

Des poudres d'épidermes de pommes blanchies ont été utilisées pour éviter le brunissement lors de la réincorporation dans de l'eau. Leur comportement sera comparé à celui de poudres non blanchies.

#### a / Influence de la quantité de poudre

L'objectif de cette série est de déterminer l'influence de la quantité de poudre sur la stabilité de l'émulsion (la taille des particules est inférieure à 200  $\mu\text{m}$ ) (Tableau 17). Les échantillons à 20 % massique de poudre présentent une texture visqueuse et s'homogénéisent difficilement en raison du taux de solide élevé.

*Tableau 17 : Augmentation du pourcentage massique de poudres d'épidermes de pommes blanchies (PB) ou non blanchies (PC).*

Echantillon		% massique
PC	1-1	5%
	1-2	10%
	1-3	20%
PB	1-1	5%
	1-2	10%
	1-3	20%



*Figure 65 : Matrices Pommes Conventionnelles (étiquettes vertes) ou Blanchies (étiquettes orange) incorporées à 5 %, 10 % et 20 % de matière sèche, soit PC 1-1, PC 1-2, PC 1-3, PB 1-1, PB 1-2 et PB 1-3 à J0 et J1.*

Dès la mise en suspension, nous pouvons observer d'importants écarts au niveau de la texture. L'échantillon PC 1-1 (5 %) est assez liquide et un crémage se devine très rapidement après homogénéisation à l'Ultra-turrax®. L'évolution à J1 montre très clairement un crémage et un léger dépôt au fond du pot (Figure 65). L'échantillon PC 1-2 (10 %) a gélifié de façon homogène dès J0 puis s'est rétracté et a rendu de l'eau au cours du temps (J4). Enfin, l'échantillon PC 1-3 (20 %) est très épais. Il est possible qu'un phénomène de gélification ait aussi eu lieu dans cet échantillon, mais il est peu visible à cause de l'importante viscosité initiale.

Les matrices blanchies se sont comportées de la même façon que les matrices conventionnelles en fonction de la teneur en poudre. Cependant, une différence a été observée pour l'échantillon PB 1-2 (10 %) qui n'a pas gélifié mais crémé, contrairement à l'échantillon PC1-2. Rappelons que ces deux échantillons ne diffèrent que par traitement de blanchiment subi par la poudre. Le traitement thermique de 20 min à 80 °C sur les épidermes de pommes frais a donc impacté les molécules responsables d'un épaississement des émulsions mais nous ne l'expliquons pas car la gélification a eu lieu dans des émulsions composées de matrices blanchies à plus faible et plus fort pourcentage massique (5 et 20 %).

#### **b/ Ajout d'acide alginique sur la stabilité de l'émulsion**

Dans une deuxième série d'essais, l'acide alginique est ajouté dans la phase aqueuse pour épaissir l'émulsion (Tableau 18). L'objectif est de déterminer l'influence de la viscosité sur la tenue de l'émulsion par ajout d'acide alginique. Ce dernier est connu pour être un agent épaississant mais il n'a pas de pouvoir tensioactif. Le pourcentage massique de poudre d'épidermes de pommes dans la phase aqueuse est constant à 5 % massique.

*Tableau 18 : Augmentation du pourcentage massique d'acide alginique dans des émulsions de poudre d'épidermes de pommes blanchis (PB) ou non (PC).*

*% m : pourcentage massique*

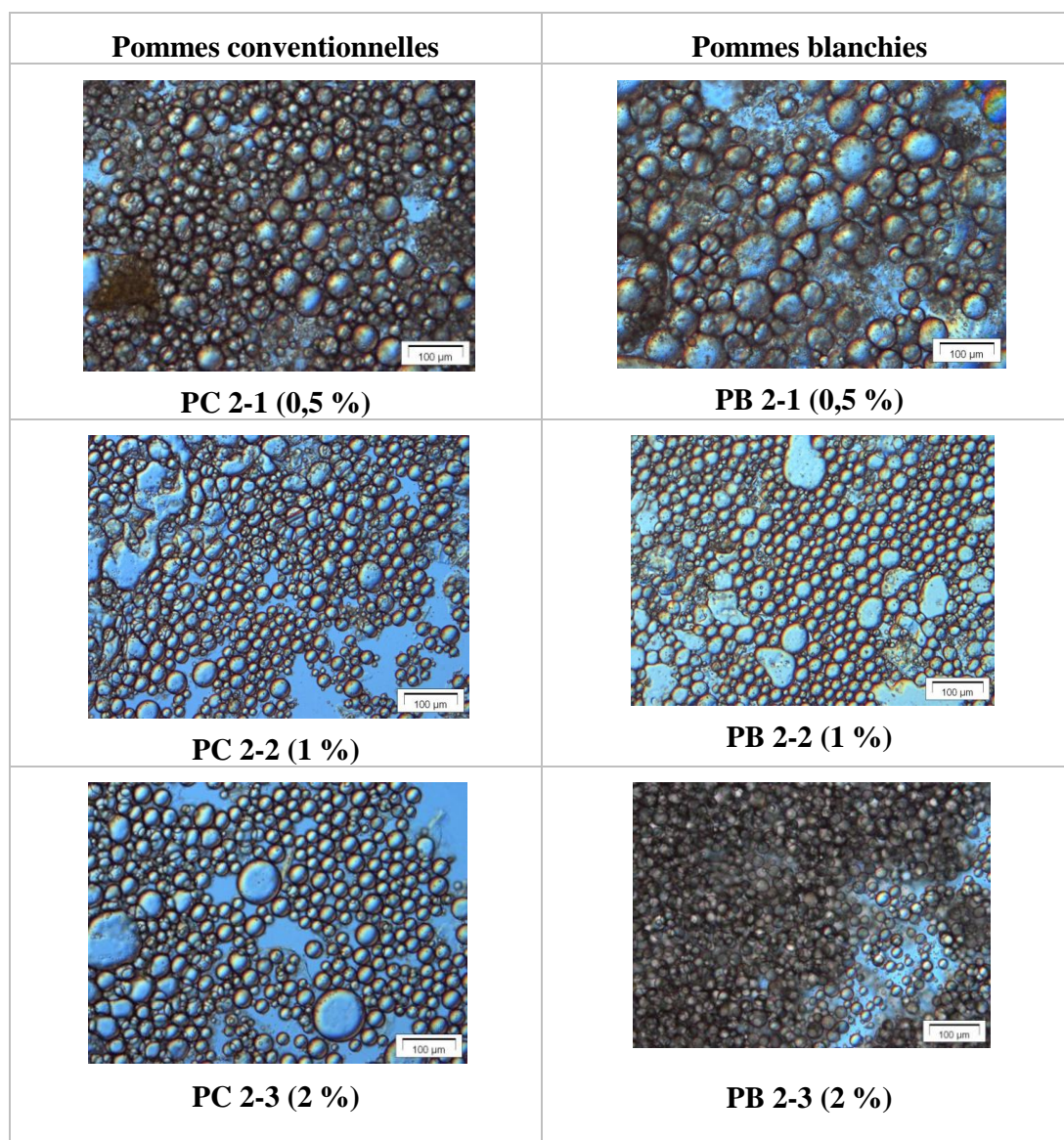
Echantillon		% massique	% m acide alginique
PC	2-1	5%	0,5%
	2-2	5%	1%
	2-3	5%	2%
PB	2-1	5%	0,5%
	2-2	5%	1%
	2-3	5%	2%



*Figure 66 : Matrices Pommes Conventionnelles (étiquettes vertes) et Pommes Blanchies (étiquettes orange) contenant de 0,5 % à 2 % d'acide alginique, soit PC 2-1, PC 2-2, PC 2-3 et PB 2-1, PB 2-2, PB 2-3 à J0 et J1.*

Les observations macroscopiques sont présentées sur la Figure 66 à J0. Les six formulations sont plutôt semblables et homogènes. Un important crémage se produit pour toutes les émulsions PC et PB à J1, avec une phase inférieure trouble pour PC 2-1 et PB 2-1 alors que les autres phases inférieures sont claires. Les gouttelettes lipidiques sont plus fines à partir de 1 % massique d'acide alginique (Figure 67). L'augmentation de la viscosité par ajout d'un épaississant permet donc de réduire la taille moyenne des gouttes d'huile. Ce comportement sera reproduit et approfondi dans le paragraphe suivant dédié aux poudres de cacao délipidé. Quelle que soit la composition du système, le blanchiment ne différencie pas le comportement des émulsions à l'échelle macroscopique. A l'échelle microscopique, l'émulsion à 2 % d'alginate obtenue avec la poudre blanchie est plus fine que l'émulsion à base de poudre non blanchie.

D'une façon générale, nous concluons de cette étude que le traitement thermique associé au blanchiment n'affecte pas les propriétés émulsifiantes des poudres d'épiderme. L'origine du phénomène de gélification observé dans la majorité des cas reste à élucider. Il est vraisemblablement lié à des interactions attractives fortes entre les particules d'épiderme dispersées.



*Figure 67: Aspect microscopique des émulsions obtenues en fonction de la teneur en acide alginique. La barre d'échelle correspond à 100 µm.*

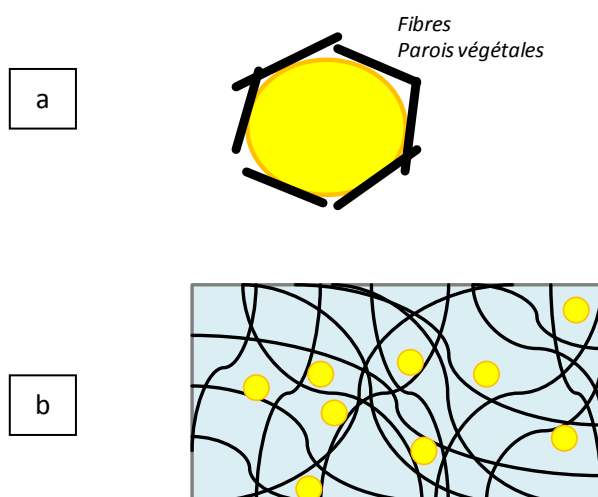


### I.3. Conclusions sur la stabilisation des émulsions avec des solides dérivés de pommes

Pour conclure, en dehors du jus de pomme, quelque soit l'échantillon testé, l'émulsion de type huile-dans-eau obtenue est relativement stable. Grâce à la lyophilisation ou au séchage, le matériel de pomme peut être conservé durablement sous forme de poudre et être réutilisé comme matériel tensioactif ou matériel fonctionnel (sucrant, épaississant, aromatisant) riche en fibres et en polyphénols, incorporable dans des matrices alimentaires. De toutes les émulsions testées, celles issues du parenchyme sont les plus fines. Cependant, cette fraction est une partie "noble" du fruit généralement consommée à l'état frais ou sous forme de compote et non comme un coproduit. Des résultats prometteurs ont toutefois été obtenus avec un réel coproduit, l'épiderme, même si les émulsions sont moins fines.

L'ensemble des essais présentés ne nous permet pas d'établir l'origine exacte des propriétés émulsionnantes des extraits de pomme. L'observation de gouttes non sphériques suggère l'adsorption d'une couche rigide de particules à l'interface huile/eau (morceaux de parois végétales, cellulose, protéines, complexes polyphénols/hydrocolloïdes) (Figure 68a). Cependant, le matériel de pomme dispersé dans l'eau constitue un gel et ne peut exclure que la stabilisation soit principalement due au piégeage des gouttes dans le réseau viscoélastique constitué par les particules (fibres et parois végétales) (Schmidt 2015). Les très récents travaux de Figueroa-Espinoza *et al.* (2015), précisent que les tanins de la pomme et notamment, les polymères d'épicatéchine auraient des propriétés émulsifiantes (propriétés des polyphénols et des hydrocolloïdes). Nous avons pu établir que les pectines et les cires ont un rôle négligeable contrairement aux polyphénols. L'utilisation d'épidermes de pommes dépectinisées ne nous a pas permis de mettre en évidence une émulsification par les pectines. Ces résultats semblent contraires aux travaux récemment obtenus par Schmidt *et al.* (2015), qui donne aux pectines d'origine végétale, des propriétés émulsifiantes. Ces hydrocolloïdes sont utilisés en industrie pour leur pouvoir gélifiant et texturant des aliments. La stabilité des émulsions proviendraient d'une augmentation de la viscosité de la phase aqueuse et donc un maintien des gouttelettes d'huile par leur immobilisation et piégeage dans un réseau végétal (Figure 68b).

Des études complémentaires visant à mesurer les propriétés rhéologiques des interfaces, la composition biochimique des poudres et la morphologie des particules seront nécessaires pour progresser dans la compréhension de la fonctionnalité de ces milieux et matrices complexes.



*Figure 68: a/ Schéma d'une goutte d'huile stabilisée par des fibres végétales ; b/ Schéma d'un réseau végétal piègeant les gouttes d'huile d'une émulsion huile dans eau.*

## II. Emulsions à base de cacao

Nous avons cherché à élargir les premiers résultats obtenus avec la pomme à une autre source végétale : le cacao. Le cacao est une matrice amphiphile qui devrait avoir un pouvoir émulsifiant plus important que la pomme, matrice hydrophile. Dans ce cas, la matrice de départ est une poudre issue du pressage de la pâte de cacao. La matière grasse résiduelle dans la poudre provoque à terme un mottage dû à la formation de ponts capillaires lipidiques entre les grains. Ce phénomène rend l'utilisation de la poudre en tant qu'auxiliaire de formulation difficile en raison de sa faible maniabilité. La poudre a donc été délipidée par extraction CO<sub>2</sub> supercritique (50 °C, 25 MPa), éventuellement lavée (voir ci-dessous) et broyée pendant 2 x 30 secondes à l'aide d'un moulin à café.

Les émulsions sont formulées à 20 % massique de miglyol et une teneur variable de poudre dispersée dans la phase aqueuse. L'énergie mécanique nécessaire à l'émulsification est apportée par un Ultra-turrax<sup>®</sup> tournant à la vitesse 24 000 rpm pendant 15 min. Les échantillons sont plongés dans un bain de glace pendant toute la durée du cisaillement afin d'éviter l'échauffement.

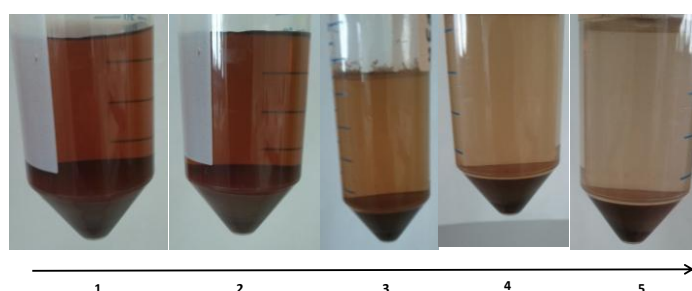
La distribution des tailles des émulsions est mesurée par granulométrie laser, fondée sur le principe de diffusion de la lumière. Les mesures sont réalisées dans des conditions de dilution forte (régime de diffusion simple). Les émulsions sont pré-diluées dans une solution aqueuse à 1% de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS). Cette solution permet de défaire les amas formés lors de l'émulsification tout en conservant la distribution initiale des gouttes. L'émulsion pré-diluée est laissée au repos pendant quelques heures pour faciliter la séparation par gravité des gouttes et des particules de cacao non adsorbées. En effet, les gouttes étant moins denses que l'eau (densité du miglyol = 0,95 g.cm<sup>-3</sup>), elles tendent à se concentrer au sommet du récipient (crémage) alors que les particules forment un sédiment. Nous évitons ainsi que les particules de cacao ne faussent les mesures granulométriques des gouttes de phase huile. Les résultats obtenus par granulométrie laser (en particulier le diamètre moyen des gouttes) sont systématiquement contrôlés par des observations au microscope optique.

### II.1. Lavage des poudres

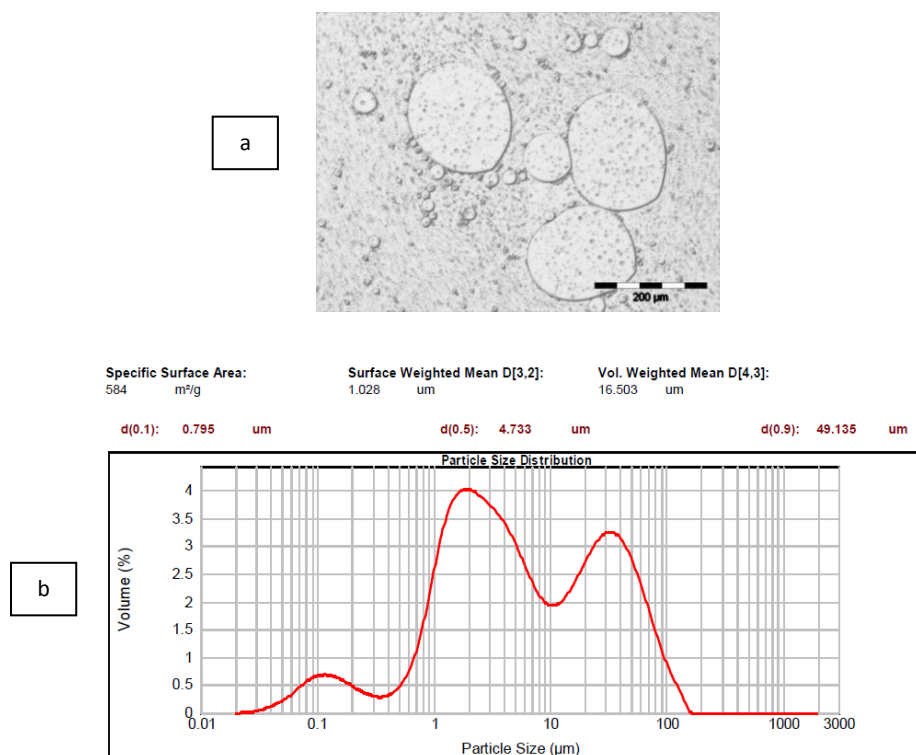
Une fois délipidées, les poudres sont soumises à plusieurs étapes de lavage selon le même protocole que précédemment: dispersion dans l'eau milli-Q, centrifugation, élimination du surnageant aqueux et dispersion dans l'eau milli-Q. Ces étapes ont été répétées au minimum 5 fois. Nous nous assurons ainsi que la stabilisation est réalisée par les particules solides et non par les espèces amphiphiles hydrosolubles susceptibles d'être dissoutes dans la phase aqueuse (protéines). Les phases surnageantes issues de ces différentes étapes (Figure 68) sont collectées et testées quand à leur pouvoir émulsionnant. Aucun d'entre elles n'a montré une aptitude à stabiliser durablement les émulsions. A titre d'illustration, nous reportons sur la Figure 69 l'image



microscopique d'une émulsion fabriquée à partir de l'une des phases surnageantes (la première de la Figure 68). Nous observons la présence de gouttes de très grand diamètre (100  $\mu\text{m}$  ou plus), confirmée par la distribution granulométrique reportée sur la même Figure 69. Les émulsions issues des eaux de lavage sont non seulement très grossières mais tendent à se déstabiliser après seulement quelques heures avec la formation d'une couche d'huile macroscopique à la surface des récipients. Les molécules amphiphiles éventuellement présentes dans la phase aqueuse ne sont donc pas capables de garantir la stabilité cinétique des émulsions. Ce résultat est confirmé par le fait que les émulsions issues de poudres lavées et non lavées sont identiques (résultats non rapportés).



*Figure 68 : Aspect des phases surnageantes aqueuses à l'issue de 5 centrifugations.*



*Figure 69 : a/ Image microscopique et b/ distribution granulométrique d'émulsion obtenue à partir d'un surnageant.*

## II.2. Impact de la quantité de matière sèche incorporée dans la phase aqueuse

Dans cette série d'expérience, nous faisons varier la quantité de poudre de cacao dispersée dans la phase aqueuse de 1 % à 10 % massique. La Figure 70 contient un cliché de microscopie optique et une photo macroscopique de chaque émulsion.

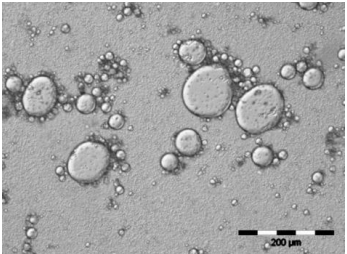

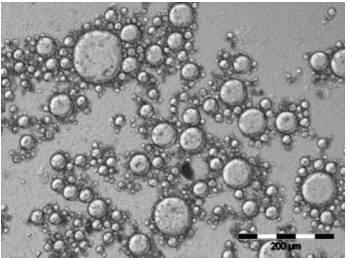

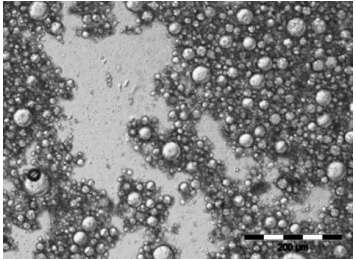
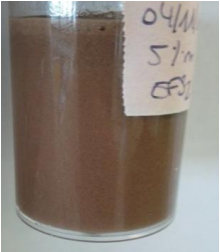
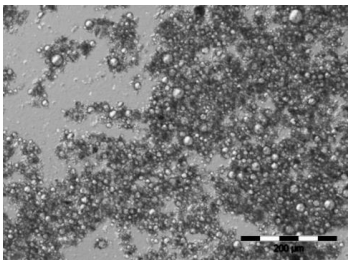

Les émulsions dont le pourcentage d'extrait sec de poudre est le plus faible (1 % et 2,5 % massique) sont très grossières et sont sujettes au crémage quelques heures après leur fabrication. Les gouttes se rassemblent à la surface du récipient et une couche huileuse transparente finit par se former quelques jours après la fabrication (stockage à 4 °C), révélant la coalescence des gouttes. L'émulsion contenant 5 % d'extrait sec présente une granulométrie plus fine et reste homogène pendant les premiers jours qui suivent sa fabrication. Un léger crémage finit toutefois par se produire après une semaine de stockage mais, contrairement aux deux échantillons précédents, il ne se forme pas une couche d'huile transparente en surface. Enfin, l'émulsion contenant 10 % d'extrait sec est relativement fine et reste macroscopiquement homogène même après un mois de stockage.

Nous observons ainsi que le diamètre moyen des gouttes diminue quand la quantité de poudre de cacao augmente. La stabilité cinétique des émulsions est également améliorée par augmentation de l'extrait sec. L'émulsion contenant 10 % de poudre de cacao est très visqueuse et les gouttes sont agrégées (Figure 70). Il est vraisemblable que les gouttes soient pontées par les particules solides.

La question de l'origine de la stabilisation se pose tout comme pour les échantillons de pomme. La Figure 71 est un cliché de microscopie optique d'une émulsion dont l'extrait sec de cacao est de 2,5 % massique. Il est clairement mis en évidence sur les surfaces des grosses gouttes, la présence de particules adsorbées formant une couverture relativement dense. L'hypothèse d'une stabilisation par les particules solides de la poudre de cacao est donc tout à fait vraisemblable. Dans les émulsions, les particules de cacao ont été broyées et affinées sous l'effet du cisaillement appliqué par l'Ultra-turrax®. Dans une expérience indépendante, nous avons élaboré une émulsion grossière par agitation manuelle. Cette fois, les particules ne sont pas fragmentées par le faible cisaillement appliqué et restent fortement agglomérées en phase aqueuse. Elles sont aisément distinguables sur les clichés de microscopie en raison de leur teinte foncée. La Figure 72 représente une goutte d'huile dont le diamètre est de l'ordre de 200 µm. On observe clairement que les amas de particules de cacao sont attachés à l'interface. Cette image n'est pas un cas isolé mais elle est représentative de l'ensemble des gouttes de l'émulsion dont les surfaces sont toujours "décorées" par des amas de particules. Cette observation prouve donc que les particules de cacao possèdent des propriétés amphiphiles. Il convient de rappeler que ces

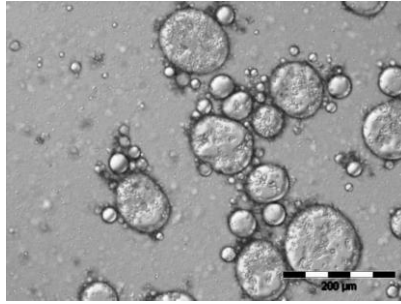
particules sont extraites d'un milieu huileux (beurre cacao) et sont préférentiellement mouillables à l'eau. Cela est confirmé par la Figure 72 où nous ne distinguons aucune particule à l'intérieur des gouttes d'huile.

Enfin, une dernière expérience a permis de prouver l'ancrage des particules sur les gouttes d'huile. Nous avons élaboré des émulsions contenant toutes 5 % de poudre de cacao et une quantité variable de miglyol : 2,5 %, 5 %, 10 % et 20 %. De façon surprenante, les gouttes ont tendance à sédimenter pour les 3 plus faibles teneurs (2,5 %, 5 %, 10 %) et à crémér pour la plus forte teneur (20 %) (Figure 73). Ce résultat ne peut s'interpréter qu'en considérant que les gouttes et les particules sont intimement liées. A faible teneur en huile, la densité moyenne du réseau de miglyol et de particules de cacao est supérieure à celle de la phase aqueuse et le réseau a donc tendance à sédimenter. Au contraire, à 20 % de miglyol, la densité moyenne est cette fois inférieure à celle de l'eau et le réseau forme alors une crème.

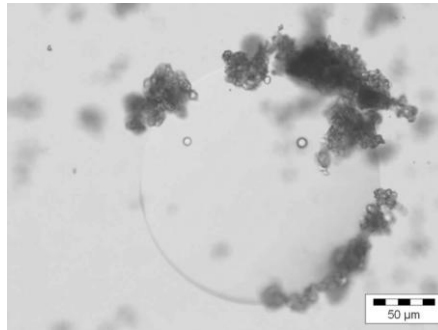
	Cliché microscopique	Cliché macroscopique
1 %m	 <p>D = 29,9 µm</p>	
2,5 %m	 <p>D = 24,7 µm</p>	
5 %m	 <p>D = 15,4 µm</p>	
10 %m	 <p>D = 12,2 µm</p>	

*Figure 70: Aspect microscopique et macroscopique des émulsions obtenues en fonction de la teneur en poudre de cacao. La barre d'échelle correspond à 200 µm.*

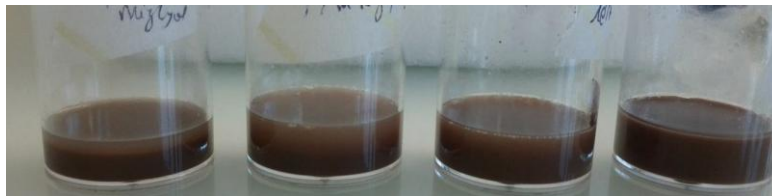
%m : % massique



*Figure 71: Image de microscopie optique d'une émulsion dont l'extrait sec est 2,5 % massique. La barre d'échelle représente 200  $\mu\text{m}$ .*



*Figure 72: Emulsion à fort grossissement.*

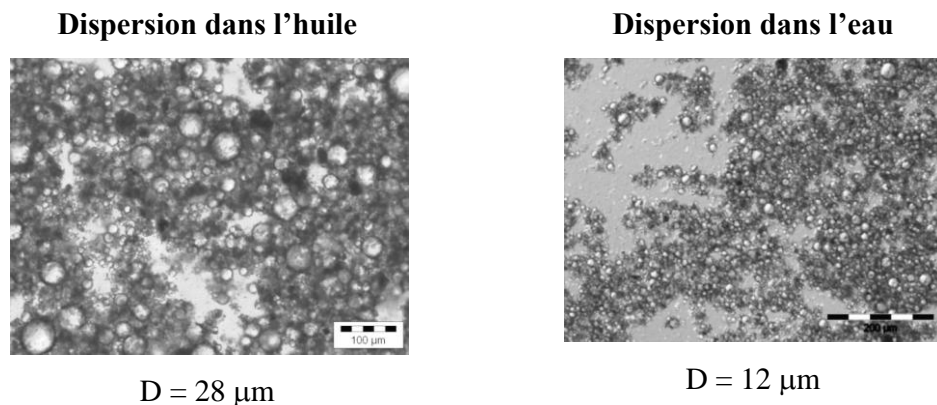


*Figure 73: Emulsions à 5 % massique de poudre de cacao et différentes teneurs en miglyol : 2,5 %, 5 %, 10 % et 20 % de gauche à droite.*

### **II.3. Impact de la phase de dispersion initiale**

Nous avons cherché à comparer les émulsions initialement dispersées dans l'huile ou dans l'eau. La composition globale des systèmes est la même, soit 20 % de miglyol, 78 % d'eau et 8 % de poudre de cacao. Dans les deux cas, l'émulsion obtenue est de type huile-dans-eau. Rappelons que selon la règle empirique de Finkle applicable aux émulsions de Pickering, l'émulsion formée est celle dont la phase continue mouille préférentiellement les particules (Finkle 1923, Pickering 1907). Le résultat obtenu prouve de façon indirecte que les particules de cacao sont

préférentiellement mouillables à l'eau. Cela a été confirmé par des observations minutieuses au microscope qui dans les deux cas révèlent la présence des particules de cacao à l'interface des gouttes ou dans la phase aqueuse et leur absence dans le volume des gouttes (Figure 72). Sur la Figure 74, nous avons reporté une image microscopique de chaque émulsion. Il est intéressant de noter que la taille moyenne des gouttes est plus élevée lorsque la poudre est initialement dispersée dans l'huile (28  $\mu\text{m}$  versus 12  $\mu\text{m}$ ). Nous en concluons que les propriétés amphiphiles varient selon la phase dans laquelle les particules sont initialement dispersées.



*Figure 74 : Emulsions obtenues après dispersion la poudre de cacao dans l'huile (gauche) et dans l'eau (droite). La barre d'échelle représente 100  $\mu\text{m}$  sur l'image de gauche et 200  $\mu\text{m}$  sur l'image de droite.*

#### II.4. Réduction de la taille des gouttes par ajout d'un épaississant dans la phase aqueuse

L'une des options permettant de réduire la taille des gouttes et de limiter la vitesse de crémage et d'épaissir la phase aqueuse. De nombreux polysaccharides d'origine naturelle ont des propriétés gélifiantes ou épaississantes tels que la gélatine, le guar, la caroube, le xanthane et l'acide alginique (Long 2012, Ercelebi 2010, Zhao 2009). Nous avons donc cherché à combiner le caractère émulsifiant de la poudre de cacao et le pouvoir épaississant de l'acide alginique pour fabriquer des émulsions fines et capables de conserver leur homogénéité au stockage pendant au moins un mois. Des émulsions ont donc été fabriquées en dissolvant 2 % massique d'acide alginique dans la phase aqueuse. Nous avons au préalable vérifié que l'acide alginique seul n'est pas en mesure de stabiliser les émulsions. La dispersion obtenue est en effet très grossière et déphase en moins de quelques heures.

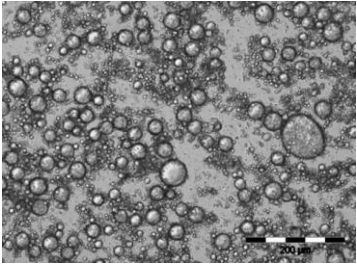
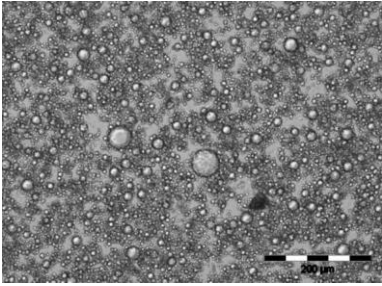
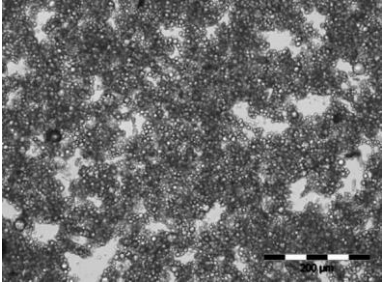
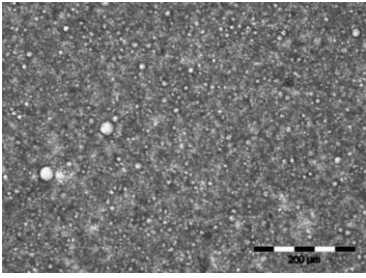
Les émulsions à base de poudre de cacao et d'acide alginique sont préparées dans les mêmes conditions que précédemment. Les émulsions contenant 1 % et 2,5 % de poudre de cacao ont montré un léger déphasage après plusieurs jours de conservation à 4 °C. En revanche, les émulsions formulées avec 5 % et 10 % dans la poudre de cacao sont restées homogènes pendant un mois.

Nous reportons sur la Figure 75 des images de microscopie optique des systèmes à J0 et à 30 jours après leur fabrication. L'évolution de la taille moyenne des gouttes est qualitativement la même qu'en l'absence d'acide alginique : le diamètre moyen des gouttes diminue lorsque la fraction massique de poudre de cacao augmente. L'émulsion à base de 1 % de poudre de cacao en phase aqueuse est assez grossière et polydisperse. Au contraire, les émulsions à 2,5 %, 5 % et 10 % sont fines et les distributions des tailles sont relativement étroites.

Il est montré que l'ajout d'acide alginique a nettement amélioré la qualité des émulsions obtenues. Comme précédemment indiqué, cela est dû au pouvoir épaississant de ce polysaccharide. Sur la Figure 75, nous avons reporté l'évolution de la viscosité (Pa.s) en fonction du gradient de cisaillement ( $s^{-1}$ ) pour les émulsions formulées avec et sans acide alginique. Comme attendu, le comportement est rhéofluidifiant dans tous les cas mais nous remarquons surtout que la viscosité est entre 10 et 100 fois plus élevée en présence d'acide alginique. Or, l'accroissement de la viscosité contribue non seulement à préserver l'homogénéité par diminution de la vitesse de crémage mais aussi à réduire le diamètre moyen des gouttes. Pour fragmenter les gouttes, il faut en effet que la contrainte visqueuse  $\tau$ , soit suffisamment élevée. Or, cette contrainte est le produit de la viscosité de la phase continue  $\eta$ , par le gradient de cisaillement  $\dot{\gamma}$ , conformément à l'équation rhéologique :  $\tau = \eta \dot{\gamma}$ . Augmenter la viscosité à gradient de cisaillement constant revient à augmenter la contrainte visqueuse, ce qui permet de faciliter la fragmentation des gouttes pendant la phase d'émulsification.

Nous remarquons aussi sur la Figure 76 que la teneur en poudre de cacao a une très forte influence sur la viscosité. Pour l'émulsion à 10 % massique de poudre de cacao, le matériau est gélifié (avec ou sans acide alginique) et possède une contrainte seuil d'écoulement (valeur non mesurée). Ce comportement de type gel préserve l'homogénéité au cours du temps.

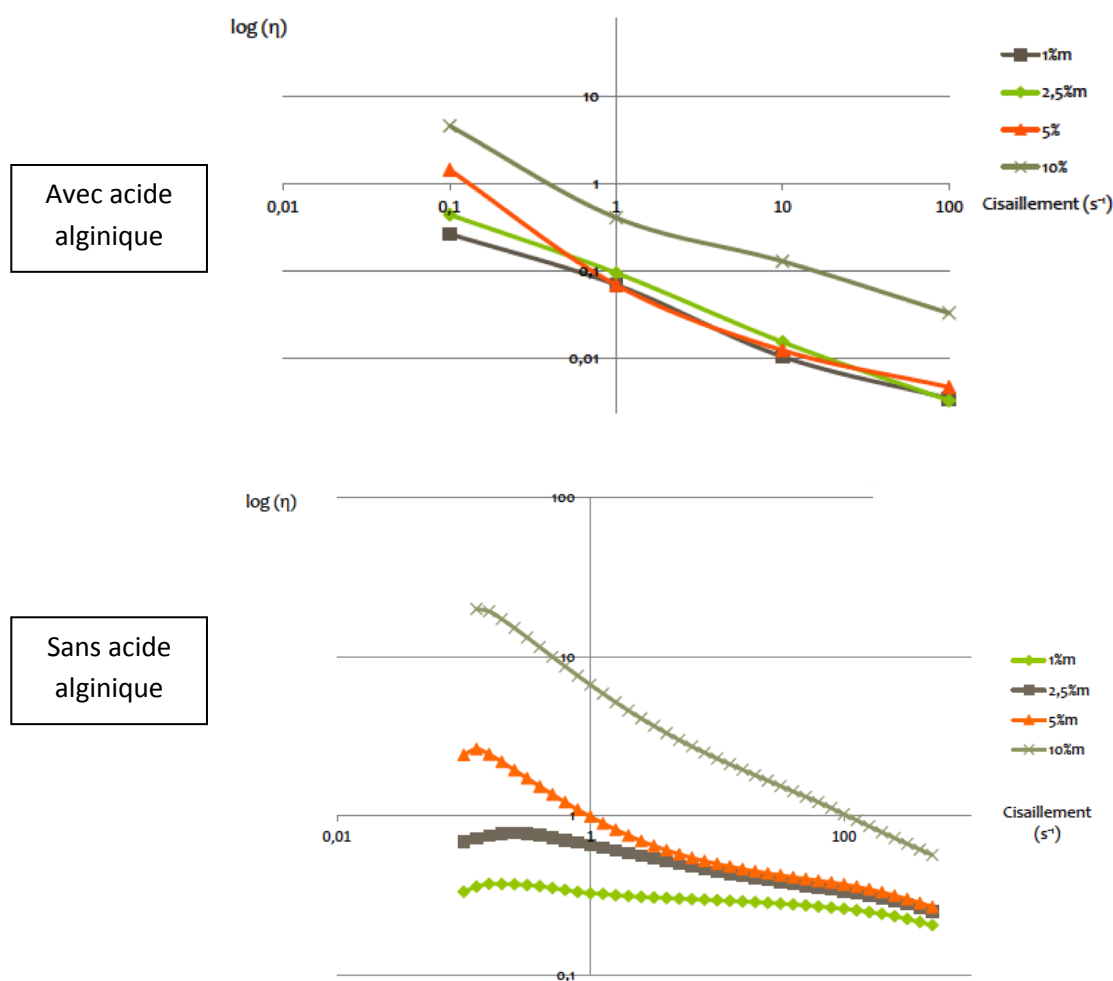


1 %m	 D = 23 μm
2,5 %m	 D = 12 μm
5 %m	 D = 10 μm
10 %m	 D = 9 μm

*Figure 75: Aspect microscopique des émulsions obtenues en fonction de la teneur en poudre de cacao. Toutes les émulsions contiennent 2 % d'acide alginique dans la phase aqueuse. La barre d'échelle correspond à 200 μm.*

*%m = pourcentage massique*





*Figure 76 : Profils de viscosité des émulsions obtenues à différentes teneurs en poudre de cacao avec (bas) et sans acide alginique (haut). La viscosité est exprimée en Pa.s.*

### III. Conclusions sur les propriétés émulsifiantes des végétaux

Dans ce chapitre, il a été démontré que des émulsions de type huile-dans-eau à base de triglycérides peuvent être stabilisées par du matériel solide de plante. Les particules végétales sont susceptibles de s'adsorber aux interfaces huile/eau et/ou de constituer un réseau gélifié capable de piéger durablement les gouttes d'huile. La bioraffinerie mise en œuvre pour collecter les particules est à ce stade très simple et empirique et pourra être développée pour améliorer la fonctionnalité des poudres végétales. Néanmoins, nous avons montré que divers traitements thermiques, supercritiques, depectination et lavage, pouvaient impacter les caractéristiques de l'émulsion en modifiant probablement les caractéristiques et les propriétés amphiphiles du matériel de plante.

La stabilité physique des émulsions a été caractérisée en suivant l'évolution cinétique de la taille des gouttes et le comportement macroscopique (crémage ou sédimentation). Il serait

également intéressant d'étudier le potentiel antioxydant des poudres en formulant des émulsions à base d'huiles polyinsaturées sensibles à l'oxydation (stabilité chimique).

Enfin, il conviendra d'élargir la gamme à d'autres sources végétales. Des travaux sont en cours actuellement à l'institut CBMN sur d'autres coproduits de transformation comme les tourteaux d'oléagineux (noix) ou bien à partir de graines (lin).

*III.*

*Extraction des polyphénols de pommes par la technologie CO<sub>2</sub>  
supercritique*

---

La technologie d'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique est utilisée pour extraire les polyphénols spécifiquement présents dans les épidermes des pommes. Nous avons choisi de traiter les épidermes plutôt que l'ensemble du coproduit issu de la fabrication des jus par exemple (gâteaux de presse : épiderme, pépins, queue, cœur de pomme...), afin de valider la mise au point de la technique sur une matrice riche en polyphénols. L'objectif ici est d'obtenir ces polyphénols sans chercher à les fractionner ou les purifier. Les épidermes traités ont été prélevés pendant la campagne de collecte des pommes, broyés et lyophilisés. Nous n'avons pas pu réaliser les campagnes d'extraction EFS sur un même lot. Les 3 lots utilisés se sont avérés contenir différentes teneurs en polyphénols, ce qui sera problématique pour l'interprétation des résultats. C'est également à l'occasion de ces extractions que nous avons mis en place l'identification et la quantification des polyphénols par CLHP, la teneur mesurée par Folin-Ciocalteu n'en donnant qu'une représentation trop globale et entachée de la contribution d'autres molécules interférentes comme l'acide ascorbique (Georgé 2005) et les sucres (Asami 2003), même si des facteurs de correction peuvent être appliqués (Lester 2012).

Comme mentionné dans l'étude bibliographique, une polarité voisine de celle de l'hexane ne permet pas au CO<sub>2</sub> pur d'extraire des molécules polaires. L'éthanol (à 96 %) a donc été choisi comme cosolvant et sera donc ajouté au CO<sub>2</sub> sur une base de 25 % molaire. L'eau peut être également un cosolvant potentiel, mais sa faible miscibilité avec le CO<sub>2</sub> générerait alors un mélange extractant diphasique qui pourrait donner lieu à un comportement singulier: la phase aqueuse pourrait s'adsorber sur les pelures déshydratées et seul le CO<sub>2</sub> *in fine* assurerait l'extraction. A l'inverse, les mélanges ternaires CO<sub>2</sub>+éthanol+eau peuvent être monophasique en fonction des proportions des composants, ce que nous détaillerons plus loin. Divers mélanges ont été utilisés dans ce travail dans l'objectif de faire varier significativement le pouvoir solvant du milieu.

Les conditions de température (50 °C) et pression (25 MPa) ont été choisies sur la base des tendances de la solubilité avec ces paramètres (la solubilité croît avec la pression, l'effet variable de la température) et des valeurs limites de l'équipement. Comme la solubilité peut augmenter ou diminuer avec la température selon le niveau de pression, des extractions ont été également conduites à 28 °C. En effet, la température critique (T<sub>c</sub>) d'un mélange CO<sub>2</sub>-éthanol croît avec la proportion d'éthanol et elle atteint par exemple 76 °C pour un mélange à 20 % massique d'EtOH (Hasbey Adil 2007). Pour le mélange à 25 % que nous avons utilisé et les températures de 28 °C ou 50 °C, nous sommes donc en dessous de la T<sub>c</sub> du mélange, ce qui signifie qu'à strictement parlé, nous utilisons un mélange subcritique et non supercritique.

Le protocole est rappelé brièvement. Les épidermes de pommes sont chargés dans une enceinte en alternance avec des billes de verre. Après mise en température et sous CO<sub>2</sub> pur à 25 MPa pendant 30 min, ce lit est balayé par le mélange CO<sub>2</sub>+cosolvant pendant un temps donné au

cours duquel la fraction solubilisée est récupérée dans le collecteur après détente du fluide. Dans ce protocole standard, dit dynamique, l'extraction se poursuit pendant environ 4,5 heures pendant lesquelles plusieurs fractions sont collectées puis le flux d'éthanol est stoppé et seul le CO<sub>2</sub> est maintenu de façon à éliminer l'alcool de la matrice avant dépressurisation. Une variante de ce procédé consiste à introduire des étapes statiques entre chaque collecte. L'objectif de ce mode dit "statique" est de laisser du temps au mélange extractant de diffuser dans la particule, mais également aux espèces de diffuser depuis la particule jusqu'au fluide.

Quelque soit le protocole, en fin d'extraction, deux types d'échantillons sont obtenus : les extraits éthanoliques et un résidu sec d'épidermes de pommes. Les fractions seront analysées en termes de masse globale extraite, de teneur en chacun des 9 polyphénols identifiés et de capacité antioxydante. Les résidus comme certaines matrices avant traitement supercritique seront analysés en termes de polyphénols totaux, afin de confirmer si l'extraction a été totale ou s'il reste encore des polyphénols dans les épidermes traités. Enfin, pour un essai, l'activité antiproliférative des fractions a été évaluée sur des cellules cancéreuses HT-29.

En parallèle des extractions à base de CO<sub>2</sub>, des macérations d'épidermes de pommes dans de l'éthanol ont été réalisées pour comparer la méthode classique et la méthode EFS.

Ce chapitre est organisé comme suit :

La première partie présente les résultats des extractions par CO<sub>2</sub>+cosolvant, réalisées sous diverses conditions afin de mettre en évidence (Tableau 19) :

- la reproductibilité des EFS,
- l'effet d'un mode dynamique ou statique,
- l'effet de la masse d'épidermes chargés dans le réacteur : 15 g, 30 g et 55 g,
- l'impact du broyage des épidermes,
- l'effet du blanchiment des pelures lyophilisées de pommes,
- et l'influence de la température d'extraction (28 °C et 50 °C) et de la composition du fluide.

La seconde partie traite plus spécifiquement de l'activité antiproliférative des extraits obtenus à partir de pommes issues de l'agriculture biologique.

La troisième partie s'intéresse plus particulièrement aux résidus et notamment à leur couleur lors d'une remise en eau afin d'évaluer l'inactivation éventuelle de l'enzyme.

Tableau 19: Récapitulatif des essais et des paramètres des extractions par CO<sub>2</sub> supercritique.

Essai	EFS	Protocole	Composition %mol (CO <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O)
Influence du protocole	EFS 13/14	statique	74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1
	EFS 9/11	dynamique	76,4 ± 1 : 20,8 ± 0,8 : 2,8 ± 0,1
Impact de la masse d'épidermes chargée	EFS 19	statique	75,8 : 21,3 : 2,9
	EFS 13/14		74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1
	EFS 15		75,2 : 21,8 : 3
	EFS 9/11	dynamique	76,4 ± 1 : 20,8 ± 0,8 : 2,8 ± 0,1
	EFS 12		75:22:03
Impact du broyage des épidermes	EFS 13/14	statique	74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1
	EFS 26		73,6 : 23,2 : 3,2
	EFS 9/11	dynamique	76,4 ± 1 : 20,8 ± 0,8 : 2,8 ± 0,1
	EFS 23		71 : 25,5 : 3,5
Impact du blanchiment	EFS 13/14	statique	74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1
	EFS 9/11	dynamique	76,4 ± 1 : 20,8 ± 0,8 : 2,8 ± 0,1
	EFS 27	statique	67,5 : 28 : 5,4
	EFS 28	dynamique	71,3 : 25,2 : 3,5
Impact de la température d'extraction	EFS 13/14	statique	74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1
	EFS 10		73,8 : 23,1 : 3,1
	EFS 9/11	dynamique	76,4 ± 1 : 20,8 ± 0,8 : 2,8 ± 0,1
	EFS 20		75:22:03
Impact de la composition du fluide	EFS 13/14	statique	74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1
	EFS 17		72,4 : 18,7 : 8,8
	EFS 18		50,4 : 43,5 : 6,1
	EFS 10		73,8 : 23,1 : 3,1
	EFS 22		49,2 : 44,6 : 6,2
	EFS 24		34,4 : 57,8 : 7,8

## I. Extraction par CO<sub>2</sub>+cosolvant des polyphénols à partir d'épidermes de pommes

Sauf mention contraire, la plupart des extractions a été réalisée avec un mélange extractant CO<sub>2</sub> et EtOH à 25 % massique. Compte tenu du fait que l'éthanol est à 96 % volumique, le mélange est en fait CO<sub>2</sub>:EtOH:H<sub>2</sub>O à 75:22:03. Les fractions sont quantifiées en termes de masse totale et de quantités de chaque polyphénol. Les courbes d'extraction sont présentées dans la suite en fonction de la masse de fluide extractant plutôt qu'en fonction du temps même si nous parlerons de "cinétique" afin de s'affranchir de la durée des étapes statiques.

### I.1. Reproductibilité des extractions

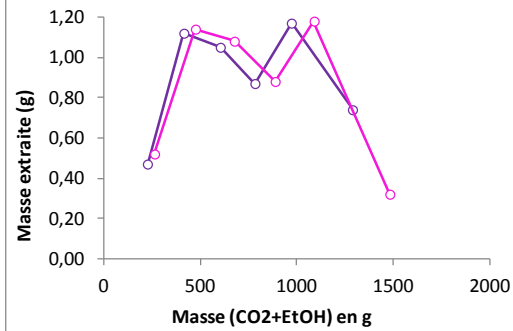
Pour s'assurer de l'impact d'un paramètre, il est nécessaire d'évaluer auparavant la reproductibilité de l'extraction. Deux extractions ont été conduites pour chacun des deux modes.

#### I.1.1. Protocole statique

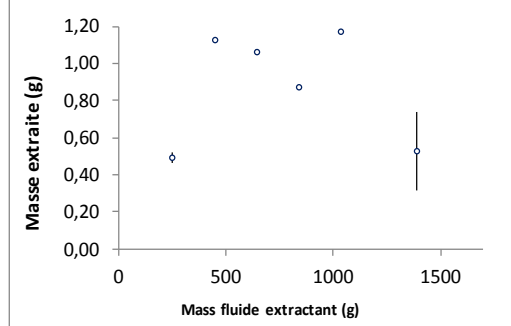
En mode statique, les conditions sont les suivantes : des périodes statiques de 30 min (réacteur isolé - aucun flux) sont alternées avec des collectes de 20 min (correspondant à une fois le volume de perçage de l'éthanol) ; charge de 29,1 g et 30 g de pelures broyées pour EFS 13 et 14 respectivement ; T = 50 °C ; P = 25 MPa ; F<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 7,3 ± 0,5 g/min ; F<sub>solvant</sub> = 3,0 ± 0,2 ml/min.

La masse extraite en fraction F5 est celle présentant la plus grande variabilité (Figure 77) mais elle n'est pas obtenue au bout de la même masse de fluide extractant. Cette fraction est obtenue en fin d'extraction par un flux uniquement de CO<sub>2</sub> pur pour éliminer tout l'éthanol présent dans le résidu et le système. Hormis cette fraction, la reproductibilité sur la quantité extraite dans chaque fraction et sur la quantité extraite cumulée est satisfaisante (écart type < 8 %) (Tableau 20, Figure 78).

L'évolution de la masse extraite dans chaque fraction au cours de l'extraction indique deux évènements : une première extraction qui culmine après 40 min de collecte (M<sub>fluide</sub> = 0,4 kg et 60 min de périodes statiques cumulées) avant de ralentir, suivie d'une reprise de l'extraction qui ne peut se poursuivre puisque l'extraction est stoppée pour démarrer la phase d'évacuation de l'éthanol de la matrice (Figure 78). Il aurait été intéressant de faire une fraction de plus en CO<sub>2</sub>+EtOH. Les résultats obtenus avec des charges plus faibles ou un protocole dynamique seront intéressants car ces conditions ont dû permettre d'extraire plus longtemps ou en saturant moins le fluide.



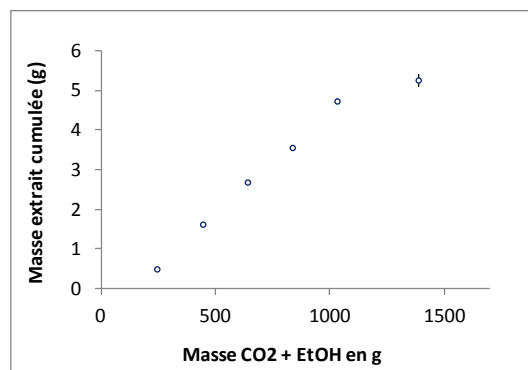
**Figure 77 :** Masse extraite dans chaque fraction de F0 à F5 - EFS 13 et EFS 14, en fonction de la masse de fluide extractant.  $\circ$  EFS 13,  $\circ$  EFS 14 (Charge  $29,5 \pm 0,5$  g, protocole statique, pelures broyées,  $50^\circ\text{C}$ , 25 MPa).



**Figure 78:** Moyenne de la masse extraite dans les fractions F0 à F5 – EFS 13 et EFS 14 en fonction de la masse de fluide extractant. Certains écarts à la moyenne sont trop petits pour être visibles.

**Tableau 20 :** Moyennes et écarts à la moyenne des masses extraites des fractions F0 à F5 - EFS 13 et EFS 14 (Charge  $29,5 \pm 0,5$  g, protocole statique, pelures broyées,  $50^\circ\text{C}$ , 25 MPa). (n=2)

Fraction	Moyenne $Q_{\text{extraite}}$	Ecart type		Moyenne $Q_{\text{extraite}}$ cumulée	Ecart type	
	(g)	(g)	%	(g)	(g)	%
F0	0,50	0,04	8,0	0,50	0,035	7,1
F1	1,13	0,01	0,8	1,63	0,05	3,0
F2	1,07	0,02	1,9	2,69	0,07	2,6
F3	0,88	0,01	1,1	3,57	0,08	2,2
F4	1,18	0,01	0,8	4,74	0,085	1,8
F5	0,53	0,3	57	5,27	0,21	4,0



**Figure 79:** Masse extraite moyenne cumulée des fractions F0 à F5 – EFS 13 et EFS 14 en fonction de la masse de  $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$  (Charge  $29,5 \pm 0,5$  g, protocole statique, pelures broyées,  $50^\circ\text{C}$ , 25 MPa). Certains écarts à la moyenne sont trop petits pour être visibles. (n=2)

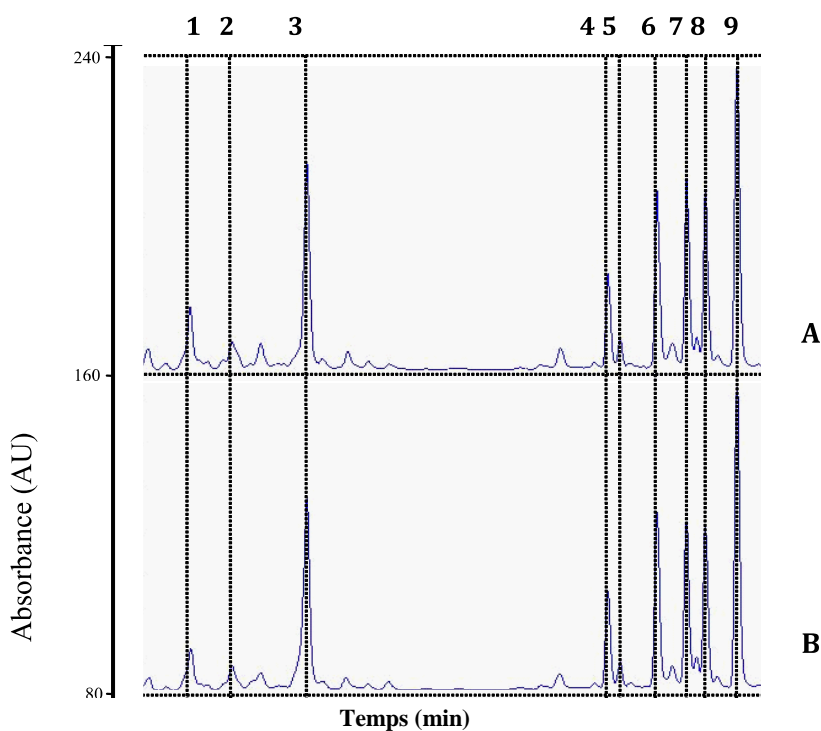
La cinétique représentée en quantité extraite cumulée (Figure 79) présente une variation linéaire sur l'ensemble de l'extraction pourvue qu'elle soit menée en  $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ . Le fléchissement à 1,5 kg de fluide résulte probablement du changement du milieu en  $\text{CO}_2$  pur. Une variation linéaire peut signifier soit la saturation du fluide (accumulation de composés en surface de



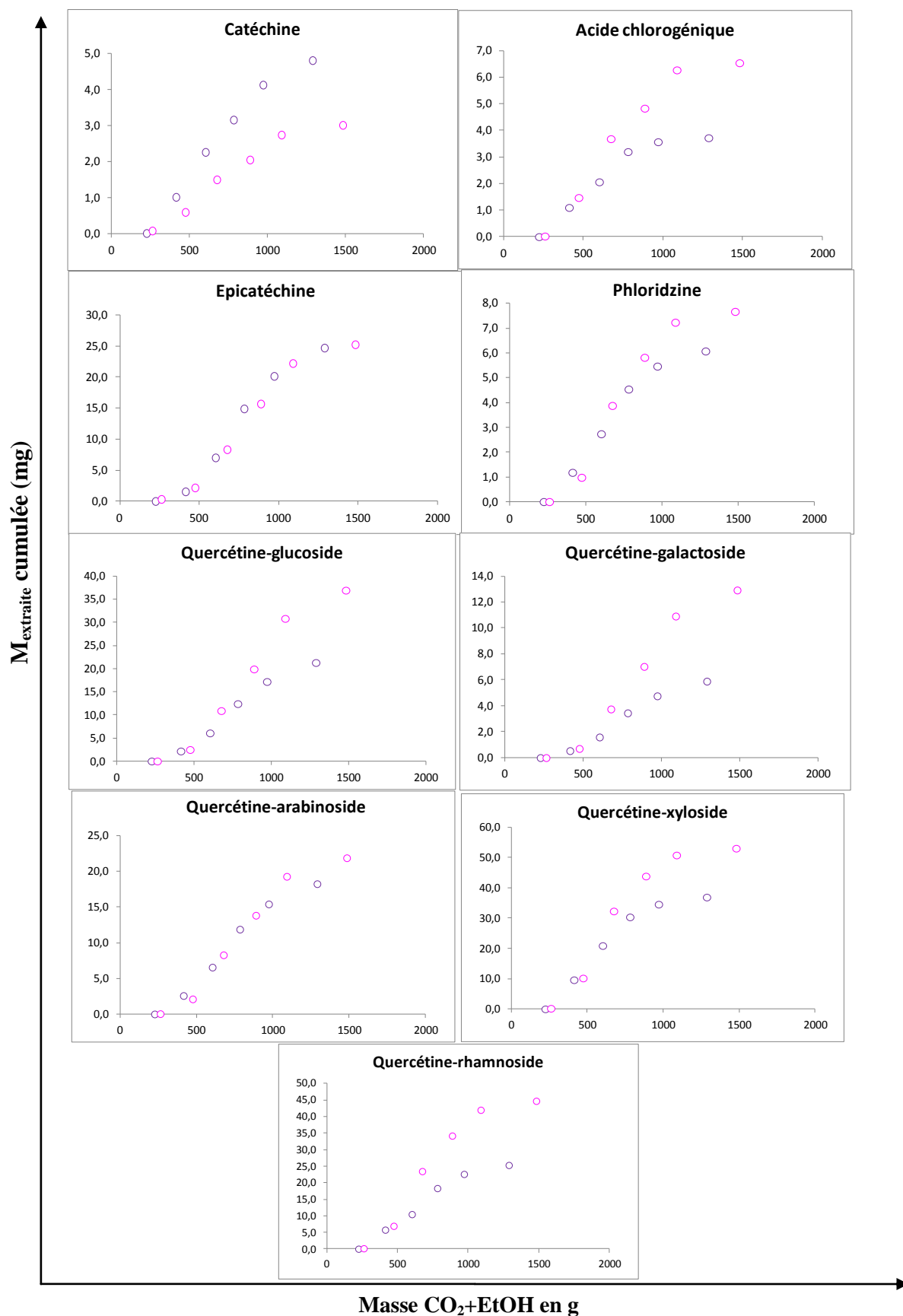
particules facilement disponibles mais le fluide ne peut les solubiliser tous), soit il n'y a pas de composés disponibles et leur arrivée en surface est limitée par le transfert au sein de la particule. L'effet du broyage et de la quantité de charge dans le réacteur devraient donner des indications sur ces hypothèses.

Globalement, dans les conditions décrites ici, environ 4,7 g de matière sont extraits avec 1 kg de fluide, à partir d'une charge de 30 g de pelures broyées et 4 g à partir de 25,7 g charge, ce qui est exactement équivalent.

Chaque fraction est plus précisément analysée en quantifiant chacun des polyphénols présents par CLHP (chapitre "Matériel & Méthodes"). Les chromatogrammes des fractions F3 sont rappelés à la Figure 80. Il est ainsi possible de représenter les cinétiques d'extraction de chaque polyphénol (Figure 81).



*Figure 80 : Profil phénolique à 280 nm des fractions F3 des deux extractions EFS 13 (A) et EFS 14 (B). Les pics correspondent à : 1) catéchine, 2) acide chlorogénique, 3) épicatechine, 4) quercétine-glucoside, 5) quercétine-galactoside, 6) quercétine-arabinoside, 7) quercétine-xyloside, 8) quercétine-rhamnoside, 9) phloridzine.*



**Figure 81 :** Masses extraites cumulées des 9 polyphénols EFS 13 et EFS 14 en fonction de la masse de  $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$  en g (Charge  $29,5 \pm 0,5$  g, protocole statique, pelures broyées,  $50^\circ\text{C}$ , 25 MPa).  $\circ$  EFS 13,  $\odot$  EFS 14.

Les courbes mettent en évidence de façon plus marquée la variabilité des masses extraites après 1 kg de fluide extractant. En revanche, la fraction F0 est la même dans les deux extractions et ne contient aucun polyphénol. Cette première fraction F0 est collectée jusqu'à ce qu'un flux continu d'éthanol apparaisse dans le collecteur cyclonique, typiquement après 20-25 minutes, pour un flux total de CO<sub>2</sub>/EtOH de 10 g/min. Elle correspond donc à la percée de l'éthanol et contient principalement les composés solubilisés pendant la période statique précédente, réalisée en CO<sub>2</sub> pur, et à toutes molécules immédiatement disponibles à la surface des particules de pommes. Nous admettons que la solubilité des polyphénols dans le CO<sub>2</sub> étant faible, ils ne se retrouvent pas dans cette première fraction.

### I.1.2. Protocole dynamique

La reproductibilité a également été étudiée sur le protocole dit dynamique dans des conditions analogues : charge respective de 27 g et 30 g de pelures broyées pour EFS 9 et EFS 11; T = 50 °C ; P = 25 MPa ; F<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 7,9 ± 0,6 g/min ; F<sub>solvant</sub> = 3,0 ± 0,2 ml/min (soit 76,4 ± 1,4 : 20,8 ± 1,3 : 2,8 ± 0,1 % molaire CO<sub>2</sub>:EtOH:H<sub>2</sub>O).

Les masses extraites de chaque fraction sont données Figure 82. Il y a plus de disparité dans le contenu de chaque fraction par rapport à l'extraction en protocole statique, avec des écarts à la moyenne entre EFS 9 et EFS 11 jusqu'à 50 % (Tableau 21). Néanmoins, dans la représentation en terme de masse extraite cumulée (Figure 83), les courbes sont globalement du même ordre de grandeur jusqu'à 1,2 kg de fluide, malgré une différence dans la charge de 10 %, puis la variabilité est marquée au delà de 1,5 kg. Sur les masses cumulées (Tableau 21, Figure 84), les écarts à la moyenne se lissent et restent inférieurs à 15 %, sauf pour la fraction F1 où l'écart de 34 % pourrait être imputable à la mise en régime de l'extraction. Avec des déviations plus importantes que celles obtenues précédemment, nous pouvons conclure que le mode dynamique est globalement moins reproductible que le mode statique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les périodes statiques laissent du temps à la diffusion de s'opérer et aux équilibres de s'établir, notamment en termes de partage des espèces entre la phase fluide et la phase solide (les pelures de pommes).

A noter également que malgré une charge moindre pour EFS 9 (27 g vs 30 g), la quantité totale extraite est plus importante avec une valeur de 0,39 g extrait/g chargé (EFS 9) contre 0,30 g extrait/g chargé (EFS 11).

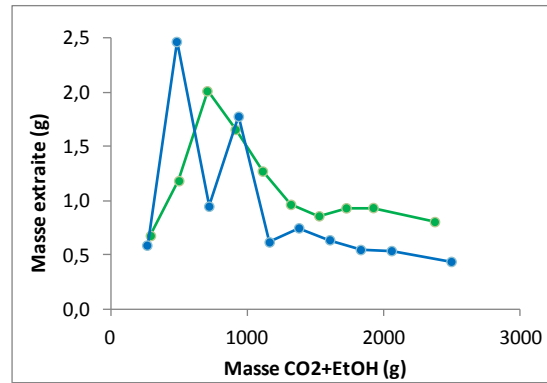


Figure 82: Masse extraite des fractions F0 à F9 pour EFS 9 et EFS 11, en fonction de la masse de CO<sub>2</sub>+EtOH (Charge 28,5 ± 1,5 g, protocole dynamique, pelures broyées, 50 °C, 25 MPa) ● EFS 9, ● EFS 11.

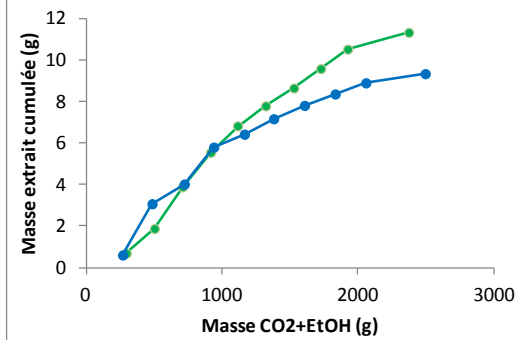


Figure 83: Masse extraite cumulée des EFS 9 et EFS 11, en fonction de la masse de CO<sub>2</sub>+EtOH (Charge 28,5 ± 1,5 g, protocole dynamique, pelures broyées, 50 °C, 25 MPa) ● EFS 9, ● EFS 11.

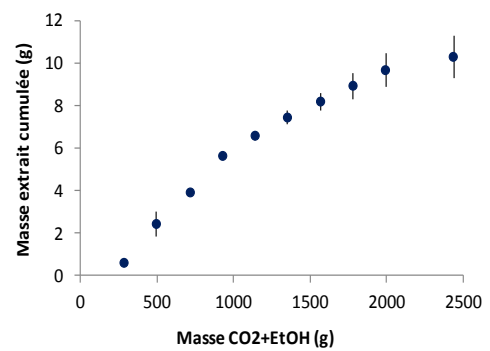


Figure 84: Masse moyenne cumulée des fractions F0 à F9 – EFS 9/ 11 en fonction de la masse de fluide extractant passée. (Charge 28,5 ± 1,5 g, protocole dynamique, pelures broyées, 50 °C, 25 MPa). Certains écarts à la moyenne sont trop petits pour être visibles. (n=2)

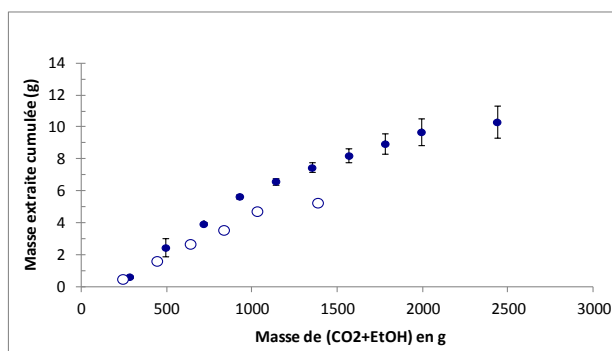
Tableau 21 : Moyennes et écarts à la moyenne des masses extraites pour chaque fraction F0 à F9 de EFS 9 et EFS 11. (n=2)

Fraction	Moyenne Q <sub>extraite</sub>	Ecart type		Moyenne Q <sub>extraite</sub> cumulée	Ecart type	
	(g)	(g)	%	(g)	(g)	%
F0	0,63	0,06	9,5	0,63	0,06	9,5
F1	1,83	0,91	49	2,46	0,84	34,0
F2	1,48	0,75	50	3,94	0,09	2,2
F3	1,72	0,09	5,2	5,66	0,18	3,2
F4	0,95	0,46	48	6,61	0,29	4,4
F5	0,86	0,15	17	7,47	0,44	5,9
F6	0,75	0,16	21	8,22	0,6	7,3
F7	0,74	0,27	36	8,96	0,87	9,7
F8	0,74	0,28	38	9,7	1,15	11,9
F9	0,62	0,26	42	10,32	1,41	13,6

## I.2. Influence du protocole dynamique ou statique

L'objectif est de comparer les deux méthodes : le mode dynamique, méthode conventionnelle et l'introduction d'étapes statiques entre les collectes de fraction (le mode statique). Le mode dynamique permet de poursuivre l'extraction plus longtemps que le mode statique, jusqu'à une fraction F9 et 2,5 kg de fluide extractant.

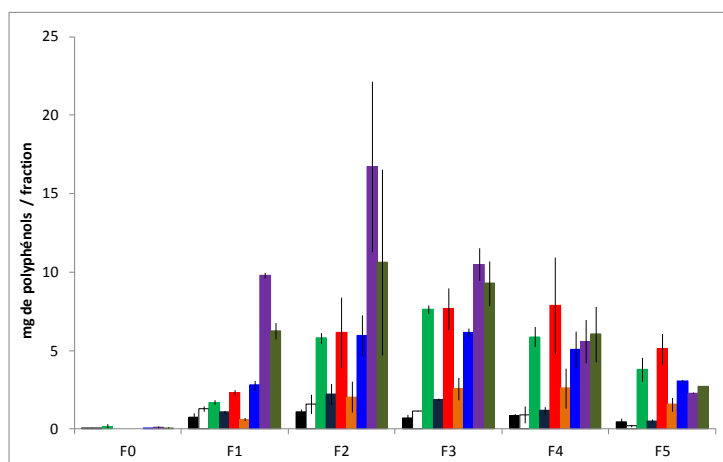
En termes de masse totale extraite (Figure 85) et jusqu'à 1,2 kg de fluide extractant, le mode dynamique conduit à une extraction un peu plus importante que le mode statique, ce qui peut sembler surprenant puisque nous avons laissé du temps à la diffusion de s'opérer. Autrement dit, nous avons permis aux espèces extractibles de diffuser depuis le cœur de la matrice jusqu'en périphérie des particules de pommes et dans le fluide. D'autre part, les équilibres ont eu le temps de s'établir. Or la phase fluide est complexe, composée de CO<sub>2</sub>, d'éthanol et d'eau, qui peuvent avoir une affinité particulière avec la matrice et donc, qui peuvent s'adsorber de façon différente sur le substrat. Les périodes statiques peuvent donc contribuer à une répartition différente des espèces extractibles entre les deux phases et par la suite générer des quantités et/ou des compositions différentes d'extraits. Une extraction moindre peut également signifier l'existence d'une réaction compétitive à l'extraction, par exemple une dégradation. En mode dynamique, la réaction de dégradation n'a pas le temps de se produire, les espèces sont extraites plus vite qu'elles ne sont dégradées. En mode statique, du temps est donné à la réaction de dégradation, avec pour conséquence une moins grande quantité de composés non dégradés extraits. Pour cette matrice complexe que constitue la pomme, les périodes statiques peuvent donc induire une redistribution des espèces extractibles et/ou des composants du fluide, ou une dégradation de certains composés.



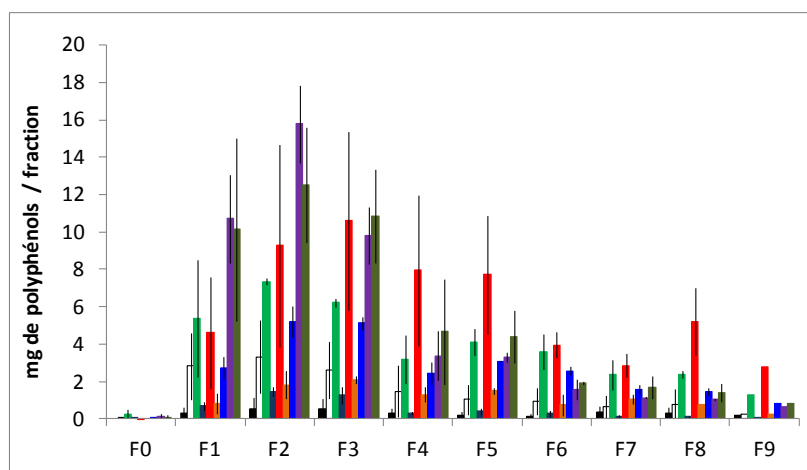
**Figure 85** : Quantité extraite cumulée globale obtenue par EFS 9/11 en dynamique (●) ou EFS 13/14 en statique (○) pour 30 g de pelures broyées. Les écarts à la moyenne dans le cas du mode statique sont trop faibles pour être visibles (25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH,  $F_{total} = 9,7 \pm 0,8$  g/min. ( $n=2$ ))

En termes de profil général d'extraction, les deux modes présentent une partie linéaire jusqu'à 1,2 kg de fluide, suivi d'un fléchissement de l'extraction quand l'extraction est poursuivie en mode dynamique. Rappelons que la dernière fraction correspond à une extraction par un flux de CO<sub>2</sub> pur. Le ralentissement de l'extraction observée peut traduire soit un début d'épuisement de la matrice, soit une extraction de molécules moins accessibles, c'est à dire pour lesquelles le transfert à l'intérieur des particules est plus difficile. Il est intéressant de noter que ce ralentissement d'extraction se produit aux alentours de la même masse de fluide consommée que celle rapportée par Farias-Compomanes *et al.* (2013) pour 20 g de marcs de raisins dans un réacteur de 415 cm<sup>3</sup>.

Le profil des polyphénols pour chaque fraction est respectivement présentés Figures 86 et 87, pour les procédures statique et dynamique. La fraction F0 contient rarement des polyphénols car la fraction collecte essentiellement ce qui a été solubilisé pendant la période statique en CO<sub>2</sub> pur. En revanche, la fraction F1 présente tous les polyphénols identifiés, indiquant que tous ces composés sont relativement accessibles dans la matrice. Leur concentration augmente dans F2 et F3 puis diminue ou reste constante à partir de F4.



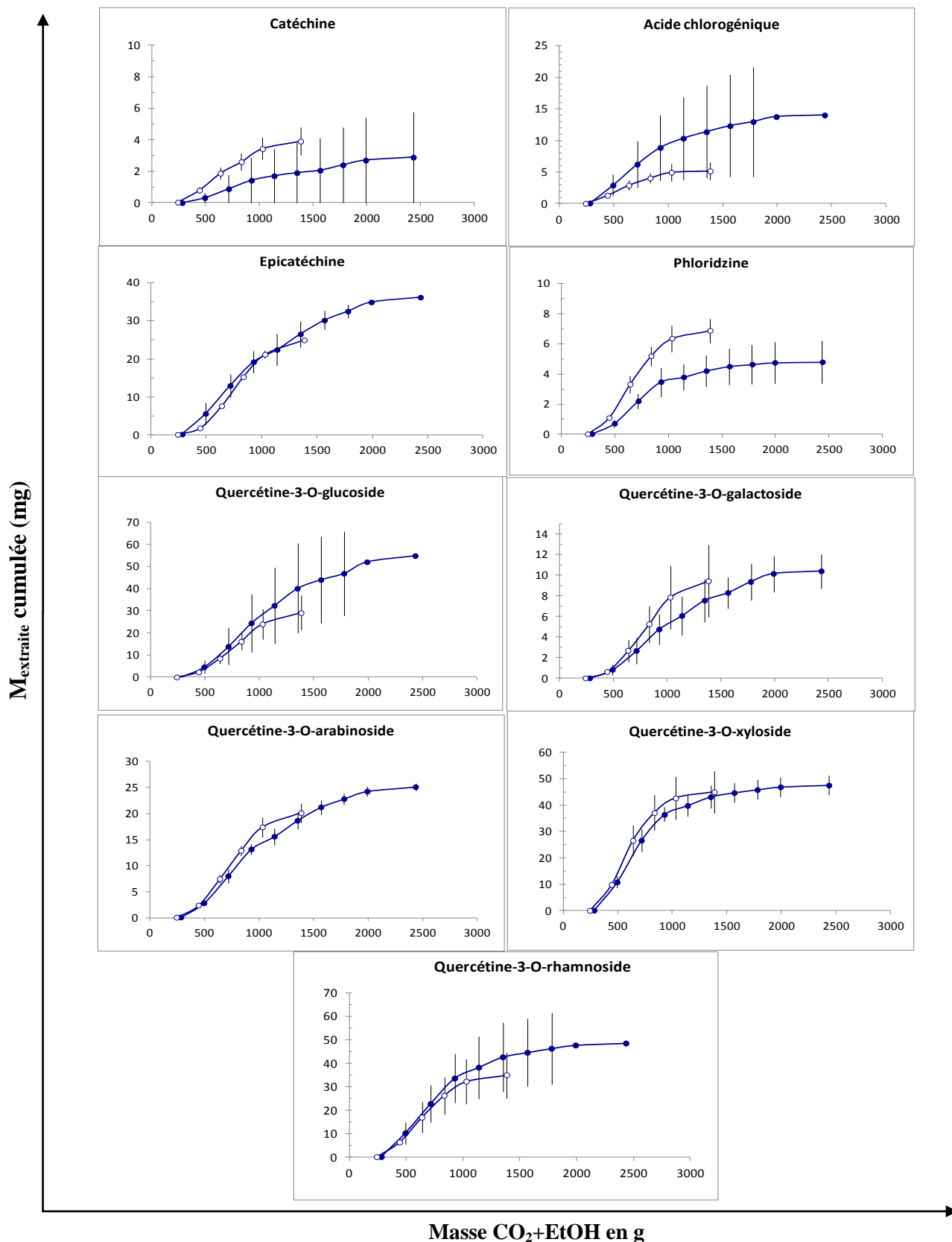
**Figure 86 :** Quantité de chaque polyphénol dans les fractions collectées durant EFS 13/14 à 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH ( $F_{total} = 9,7 \pm 0,8$  g/min), procédure statique,  $29 \pm 0,5$  g de pelures de pommes lyophilisées broyées. ■ Catéchine, □ Acide chlorogénique, ■ Epicatéchine, ■ Phloridzine, ■ Quercétine-glucoside, ■ Quercétine-galactoside, ■ Quercétine-arabinoside, ■ Quercétine-xyloside (ég. Q-Ara), ■ Quercétine-rhamnoside (ég. Q-Ara). ( $n=2$ , écart à la moyenne)



**Figure 87** : Quantité de chaque polyphénol dans les fractions collectées durant EFS 9/11 à 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH ( $F_{total} = 9,7 \pm 0,8$  g/min), procédure dynamique,  $28,5 \pm 1,5$  g de pelures de pommes lyophilisées broyées. ■ Catéchine, □ Acide chlorogénique, ■ Epicatéchine, ■ Phloridzine, ■ Quercétine-glucoside, ■ Quercétine-galactoside, ■ Quercétine-arabinoside, ■ Quercétine-xyloside (ég. Q-Ara), ■ Quercétine-rhamnoside (ég. Q-Ara). (n=2, écart à la moyenne)

Les courbes de masses extraites cumulées pour chaque polyphénol dans les deux conditions sont présentées Figure 88. Comme pour la masse totale extraite, la reproductibilité sur les polyphénols est globalement meilleure en mode statique qu'en mode dynamique. La reproductibilité est critique dans les conditions en dynamique pour la catéchine, l'acide chlorogénique, les quercétine-glucoside et -rhamnoside. La catéchine et l'acide chlorogénique sont élués dans le chromatogramme sous forme de pics de faible intensité et sont co-élus avec d'autres pics (Figure 80) ce qui en complique leur quantification. Par ailleurs, l'acide chlorogénique (Colin-Henrion 2008, Nicolas 1994, Amaki 2011) et la catéchine (Yi 2013), sont des substrats privilégiés de la polyphénoloxydase et cela peut introduire une source supplémentaire de variation. Cette hypothèse ne s'applique pas aux dérivés de quercétine.

Les profils d'extraction des polyphénols sont similaires quelque soit le composé avec une extraction constante jusqu'à 1,1 kg de fluide. Au delà (extraction dynamique), l'extraction des polyphénols se ralentit sans pour autant être terminée, puisque aucun plateau n'est observé à part pour la phloridzine et la quercétine-xyloside. Ces résultats sont cohérents avec ceux d'Hasbey Adil *et al.* (2007) montrant que 80 g de fluide/g de matrice sont nécessaires pour atteindre un plateau dans le cas d'un broyat de pommes. Dans nos propres essais, les 2 kg de fluide passé correspondent à un ratio fluide/matrice de 67. Au regard de la reproductibilité, l'introduction d'une période statique entre les collectes dynamiques n'améliore pas le rendement d'extraction, excepté pour la phloridzine et dans une moindre mesure pour la catéchine.



*Figure 88 : Quantités extraites cumulées (en mg) des polyphénols obtenue par EFS 9/11 en dynamique (●) ou EFS 13/14 en statique (○) sur 30 g de pelures de pommes lyophilisées broyées (25MPa, 50 °C et  $\text{CO}_2 + 25\% \text{ EtOH}$ ,  $F_{\text{total}} = 9,7 \pm 0,8 \text{ g/min}$ ). ( $n=2$ , écart à la moyenne)*



Les quantités cumulées des polyphénols extraits à 1,1 kg de fluide pour 30 g chargés sont récapitulées dans le Tableau 22. Pour comparer avec les autres méthodes d'extraction ou la littérature, les données sont présentées pour 100 g de matrice pomme.

**Tableau 22:** Rendement des composés phénoliques extraits pour chacune des conditions statique EFS 13/14, dynamique EFS 9/11, macération éthanol et extraction méthanol/acétone/eau sur des épidermes de pommes Golden. (n=2, écart à la moyenne)

<sup>a</sup> pour 1,1 kg de fluide extractant FSC

<sup>b</sup> exprimé en équivalent quercétine-arabinoside

<sup>c</sup> données correspondant à une moyenne entre les résultats statique et dynamique quand ils sont similaires.

<sup>d</sup> pelures sèches = pelures lyophilisées contenant 5-7 % d'humidité

Méthode	EFS 13/14 - statique 30g	EFS 9/11 - dynamique 30g	Macération	Solvant
Solvant (mol)	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 75:22:03	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 75:22:03	EtOH: H <sub>2</sub> O 88:12:00	MeOH + Ace/H <sub>2</sub> O
Ratio solvant/pelures <sup>a</sup>	37	37	8	30
T / P	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa	45°C / 0,1 Mpa	20°C / 0,1 Mpa
Rendement global <sup>a</sup> (g/100g pelures sèches <sup>d</sup> )	15,8 ± 0,2	22,0 ± 0,7	65 ± 2	3,2
Quantité de polyphénols <sup>a</sup> (mg/100g de pelures sèches <sup>d</sup> )				
Polyphénols totaux	550 ± 115	603 ± 182	177 ± 32	792 ± 26
Catéchine	11,4 ± 2,3	6,0 ± 6,0	0	25,7 ± 0,2
Acide chlorogénique	16,4 ± 4,5	36,2 ± 23,0	58,3 ± 11,8	319,7 ± 18,0
Epicatechine	71,6 ± 3,4	78,7 ± 11,4	28,5 ± 4,6	43,5 ± 1,9
Phloridzine	21,5 ± 3,0	13,2 ± 3,0	2,3 ± 0,28	15,3 ± 0,5
Quercétine-3-glucoside	81,2 ± 23,0	113,7 ± 60,4	26,1 ± 4,9	86,6 ± 2,3
Quercétine-3-galactoside	26,5 ± 10,4	21,2 ± 5,7	3,7 ± 0,05	97,1 ± 1,7
Quercétine-3-arabinoside	67,6 ± 8,3	54,6 ± 5,7	35,0 ± 6,0	49,1 ± 1,9
Quercétine-3-xyloside <sup>b</sup>	144,5 ± 27,5	139,8 ± 14,2	9,6 ± 2,8	69,8 ± 2,6
Quercétine-3-rhamnoside <sup>b</sup>	109,3 ± 32,8	134,2 ± 46,4	13,6 ± 2,0	85,6 ± 13,6
Concentration en polyphénols totaux (g polyphénols/kg extrait)	34,7	27,4	2,5	247

Par l'extraction par fluide supercritique, les quantités cumulées de polyphénols sont de l'ordre de 600 mg/100 g pelures lyophilisées et le groupe de quercétines glycosides représente 77-78 % des polyphénols totaux. En composé individuel, la catéchine, l'acide chlorogénique, la phloridzine et la quercétine-galactoside sont extraits à hauteur de 6-36 mg/100 g de pelures lyophilisées alors que l'epicatechine et les autres quercétines sont autour de 55-140 mg/100 g de pelures lyophilisées. Comparée à la macération à l'éthanol, la combinaison CO<sub>2</sub>+éthanol améliore l'extraction de tous les polyphénols (excepté pour l'acide chlorogénique). Cette tendance est mise en évidence par Farias-Compomanes *et al.* (2013) dans le cas d'extraction de marcs de raisins. Le rendement total des polyphénols dans l'échantillon macéré est de 177 mg/100 g de pelures

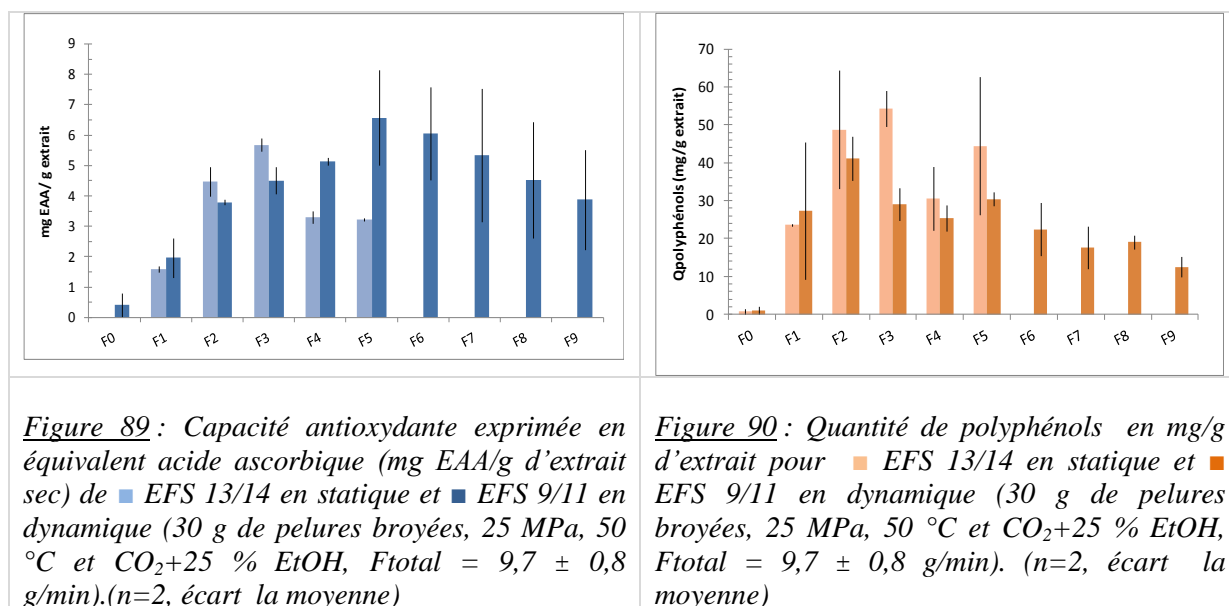
lyophilisées et les dérivés glycosilés représentent environ 50 % du total des polyphénols. Lors d'une extraction méthanol/acétone/eau, la quantité de polyphénols est de 792 mg/100 g pelures lyophilisées avec un taux de 50 % de dérivés quercétines et 40 % d'acide chlorogénique. L'abondance de l'acide chlorogénique et des dérivés quercétines, spécifiquement –galactoside qui en représente la moitié, est reportée dans la littérature pour les pelures fraîches de *Golden* extraites par le méthanol (Tsao 2003). Cependant, l'épicatéchine et la phloridzine sont moins abondants dans les échantillons rapportés dans certains articles scientifiques (Ceymann 2012, Huber 2009). Il est reconnu que les compositions et les concentrations en polyphénols dans les fruits varient en fonction de la variété, de la saison, de la localisation géographique, de la variabilité génétique (Lata 2007, Yi 2013, Manach 2004) et des conditions d'extraction (échantillon ratio/solvant, temps d'exposition, température...) (Rupasinghe 2011). L'abondance de l'acide chlorogénique dans un extrait préparé avec la méthode méthanol/acétone/eau peut provenir de l'utilisation d'acétone, qui par inhibition de l'enzyme polyphénoloxydase préserve le contenu original des fruits (Feliciano 2010). Par ailleurs, la somme des polyphénols totaux quantifiés par CLHP du marc de pommes *Gala* extraits avec un mélange acétone/eau est de 7,24 g/kg de matière sèche dont plus de 50 % est imputable aux quercétines glycosilées (Lu 1997). Le pool de dérivés quercétines représente également les principaux composants polyphénoliques des extraits méthanol/eau de 7 variétés de pelures de pommes, avec un contenu de 0,1-0,9 g/kg de poids frais, soit environ à 40-360 mg/100 g de matière sèche (Karaman 2013). Le taux de quercétines glycosilées dans nos extraits et leur forte contribution au pool des polyphénols totaux sont donc cohérents avec les données de la littérature.

Si nous regardons la cohérence de nos résultats avec la seule étude d'extraction supercritique de pommes publiée par Hasbey Adil *et al.* (2007), il faut d'abord rappeler que les concentrations de polyphénol individuel ne sont pas mesurées par CLHP et que la quantité de polyphénols totaux est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Exprimé en équivalent acide gallique (GAE), les contenus respectifs de 171 mg GAE/100 g d'échantillon et 47 mg GAE/100 g d'échantillon sont rapportés pour des extractions éthanol et du mélange CO<sub>2</sub>+20 % EtOH massique, avec une tendance inverse à nos propres conclusions. Cependant, le réactif de Folin-Ciocalteu ne mesure pas seulement les phénols et réagit avec plusieurs molécules. Outre les phénols, les composés contenant de l'azote, les trioses "glycéraldéhyde", les dérivés de vitamines ou les protéines réagissent à cette réaction (Everette 2010). Pour les purées de pommes et les jus, la contribution de ces substances interférentes peut être respectivement de 31 % et 48 % (Hasbey Adil 2007).

Les composés phénoliques ne sont pas les seuls composés extraits par l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique. Le rendement global est de l'ordre du gramme (Figures 85 et 88, Tableau 22) alors que les polyphénols extraits sont de l'ordre de dizaines de milligrammes. Avec des valeurs de 27-

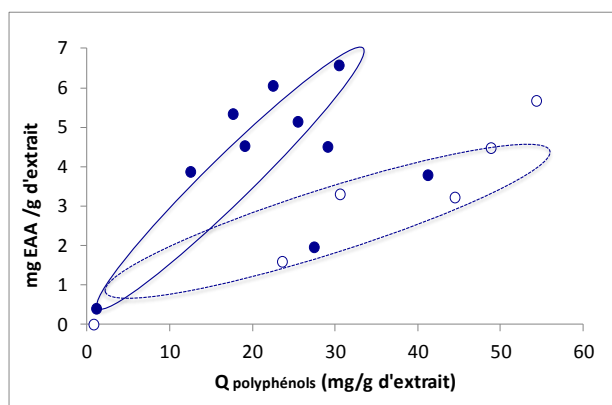
35 g/kg d'extrait à 1,1 kg de fluide (Tableau 22), les polyphénols ne représentent que 3 % de l'extrait global. Bien que la quantification prenne seulement en compte les composés identifiés, la différence est trop importante pour ne provenir que des polyphénols non identifiés. La présence d'autres composés dans l'extrait est inhérente à l'utilisation de l'éthanol qui n'est pas sélectif. Une gamme similaire d'une variabilité du gramme à quelques dizaines de mg par kg d'extrait est rapportée dans la littérature (Farias-Camponames 2013, Laroze 2010, Serra 2010b) indiquant une extraction substantielle de composés multiples autre que les polyphénols quelque soit la matrice étudiée. Des dosages de sucres ont été réalisés sur les matières premières avant et après extraction FSC (voir plus loin). La diminution de leur concentration dans la matrice après extraction signifie qu'une partie des sucres se trouve dans les fractions EFS.

Les fractions ont été analysées en termes de capacité antioxydante (Figure 89). Sur la Figure 90, est reportée la quantité des polyphénols dans chaque fraction, calculée en sommant les quantités individuelles mesurées par CLHP. Pour le mode statique (EFS 13/14), les fractions F2 et F3 possèdent la plus grande capacité antioxydante (5-6 mg EAA/g d'extrait) et ce sont les fractions les plus riches en polyphénols. Pour le mode dynamique (EFS 9/11), ce sont plutôt les fractions à partir de F5 qui ont une capacité antioxydante élevée alors qu'elles ne sont pas les plus riches en polyphénols.



Une représentation plus précise est donnée Figure 91, pour corréler l'activité antioxydante et la concentration en polyphénols des fractions. Les résultats en mode statique montrent une bonne corrélation ( $r^2 = 0,916$ ), alors que les données de la procédure dynamique sont plus dispersées ( $r^2 < 0,15$ ). Les deux données hors du groupe pour la tendance en dynamique correspondent aux

fractions F1 et F2, donc aux premiers temps de l'extraction. La dispersion des données et la pertinence des corrélations dépendent de la procédure. Ceci semble indiquer que les composés non phénoliques contribuent à l'activité antioxydante, ou bien que seuls quelques polyphénols sont responsables de cette activité plutôt que l'ensemble du pool.

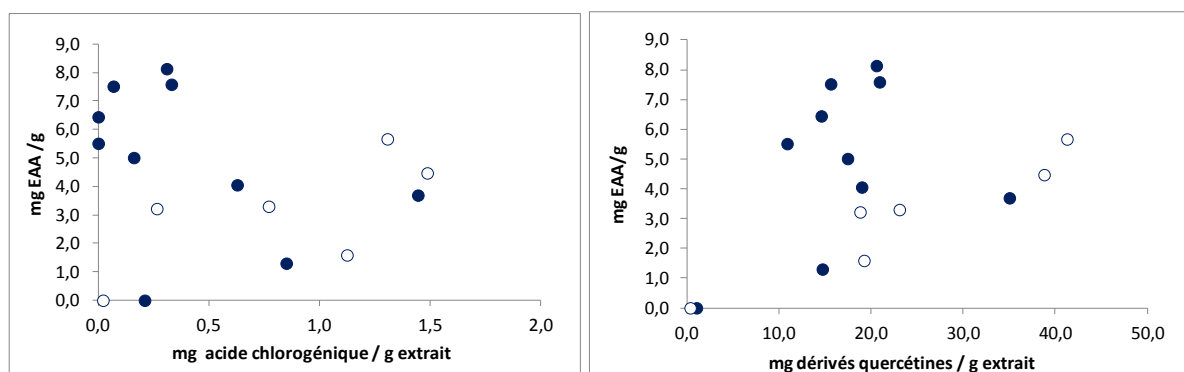


**Figure 91 :** Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols (mg/g d'extrait sec) dans chaque fraction obtenue par  $\circ$  EFS 13/14 en statique ou  $\bullet$  EFS 9/11 en dynamique (30 g de pelures broyées, 25 MPa, 50 °C et  $\text{CO}_2 + 25\% \text{ EtOH}$ ,  $F_{\text{total}} = 9,7 \pm 0,8 \text{ g/min}$ ).

Dans la littérature, les activités antioxydantes ne correspondent pas nécessairement à une forte concentration en phénols. Une corrélation positive est trouvée dans 56 végétaux selon Deng *et al.* (2013) alors qu'il n'y a pas de relation selon Ismail *et al.* (2004) pour 9 végétaux. Les différentes méthodes utilisées pour produire les extraits et pour déterminer la contenu en polyphénols et la capacité antioxydante peuvent générer des sélectivités et des réponses différentes. Dans un second temps, tous les polyphénols ne possèdent pas la même activité antioxydante (Tabart 2009). Les composés phénoliques ont une structure chimique permettant une activité antioxydante. En effet, ils possèdent des groupes hydroxyl phénoliques capable de céder un atome hydrogène ou un électron à un radical libre et se compose d'un système conjugué aromatique permettant de délocaliser un électron non apparié. Comme le montre Day et Mumper (Dai 2010), l'acide chlorogénique (dérivé de l'acide hydroxycinnamique) est considéré comme un agent antioxydant car il possède une structure ortho-dihydroxy lié à un  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}^-$ , autorisant une délocalisation de l'électron par résonance. Parmi les flavonoïdes, la quercétine possède un fort pouvoir antioxydant car elle combine : un catéchol sur le cycle B, une double liaison 2,3 avec une fonction 4-oxo sur le cycle C et des groupes 3 et 5-hydroxyl avec des fonctions 4-oxo sur les cycles A et C. Le groupe 3-hydroxyl est important pour l'activité antioxydante. En revanche, une glycosylation en 3 peut réduire l'activité comparée à son équivalent aglycone (Dai 2010), mais les dérivés glycosylés de quercétines ont d'autres atouts. Quand elles sont testées en tant qu'inhibiteur de l'oxydation d'huiles de poisson, les quercétines-3-O-glucoside, -galactoside

et -rhamnoside montrent une efficacité semblable ou légèrement supérieure aux quercétines aglycones (Huber 2009). Pour la phloridzine, c'est la forme 2-glycosilée qui présente une plus faible inhibition que son aglycone phlorétine (Rupasinghe 2010b). Dans le cas des pommes, leur activité est de l'ordre de 2  $\mu\text{mol}$  de Trolox équivalent/100 g de fruit sur la variété *Golden* (Serra 2010a). Huit autres variétés de pommes sont étudiées dont la catéchine, l'épicatéchine, la procyanidine B2 et la quercétine-3-glucoside sont identifiés comme des contributeurs majeurs de l'activité antioxydante (extraits de parenchymes et d'épidermes, ORAC, HORAC et analyse LDL). Pour un gâteau de presse de jus de pommes *Fuji*, *Granny Smith* et *Qinguan*, l'activité antioxydante, exprimée en ABTS, est positivement corrélée avec le contenu en polyphénols, notamment avec la présence spécifique de la procyanidine B2, l'acide chlorogénique et la quercétine (Bai 2013).

La recherche d'une corrélation a donc été affinée en se limitant soit à la teneur en acide chlorogénique, soit au pool des dérivés quercétines (Figure 92). Pour les résultats du mode statique, la corrélation est bonne avec la somme des dérivés de quercétine ( $r^2 = 0,9048$ ) alors qu'elle l'est moins avec l'acide chlorogénique ( $r^2 = 0,4805$ ). En revanche aucune corrélation n'est observée entre ces deux groupes de polyphénols et l'activité antioxydante pour les fractions collectées en mode dynamique.



*Figure 92 : Tests de corrélation entre la capacité antioxydante en mg EAA/g d'extrait sec et la teneur d'acide chlorogénique (mg/g) d'une part, et la teneur de dérivés quercétine (mg/g) d'autre part, pour le mode dynamique ● EFS 9/11 et le mode statique ○ EFS 13/14.*

### I.3. Influence de la masse d'épiderme chargée dans le réacteur

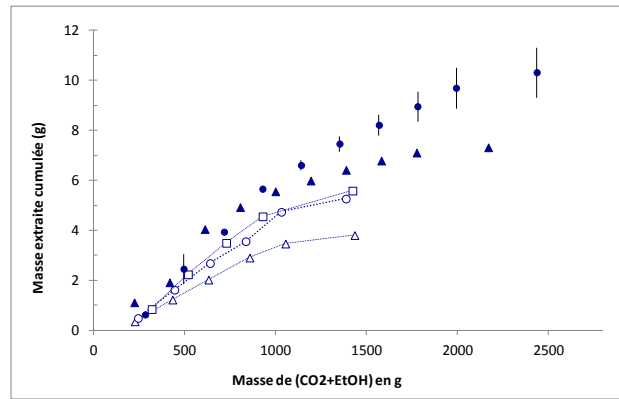
Les EFS ont été effectuées avec différentes quantités d'épidermes de pommes chargées dans le réacteur : 15 g, 30 g et 55 g en procédure statique, 15 g et 30 g en dynamique. Les extractions sont présentées Tableau 23.

*Tableau 23: Descriptif des extractions réalisées dans le cadre de l'influence de la masse chargée dans le réacteur.*

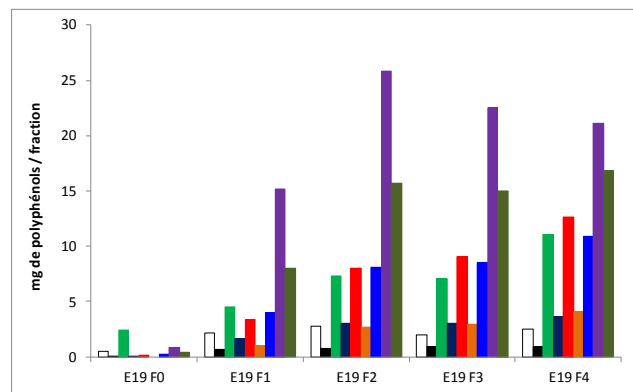
EFS	Charge	T°	Protocole	Composition %mol (CO <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O)	Nombre de fractions	M <sub>totale</sub> extraite	M <sub>fluide</sub>	Lot pommes
EFS 19	55 g	50°C	statique	75,8 : 21,3 : 2,9	F0 à F4	5,59 g	1422 g	1
EFS 13/14	29,5 ± 0,5 g	50°C	statique	74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1	F0 à F5	5,27 ± 0,15 g	1386 ± 137 g	1
EFS 15	15 g	50°C	statique	75,2 : 21,8 : 3	F0 à F5	3,81 g	1432 g	1
EFS 9/11	28,5 ± 1,5 g	50°C	dynamique	76,4 ± 1 : 20,8 ± 0,8 : 2,8 ± 0,1	F0 à F9	10,3 ± 1 g	2436 ± 60 g	1
EFS 12	15 g	50°C	dynamique	75:22:03	F0 à F9	7,33 g	2166 g	1

L'augmentation de la charge n'améliore pas la quantité extraite globale dans les mêmes proportions qu'une augmentation de la charge (Figure 93). Pour les deux premières fractions (jusqu'à 0,5 kg de fluide), la quantité extraite globale est du même ordre quelque soit la masse chargée, même avec 55 g chargés. Ensuite, l'augmentation de la charge de 15 g à 30 g améliore le taux d'extraction mais pas d'un facteur deux. De plus, les courbes avec des charges de 30 g ou 55 g (protocole statique) peuvent se superposer. La faible quantité extraite avec la masse de matière traitée laisse supposer une saturation du fluide ou l'existence d'un chemin préférentiel pour le fluide au sein le lit d'épidermes de pommes. Le lit est une alternance de couches de pommes et de billes de verres dont l'épaisseur des couches de pommes est adaptée en fonction de la quantité de matière chargée. Plus de charge signifie une plus grande quantité d'épiderme entre deux couches de billes, même si le lit se trouve plus compacté, cela semble nuire au transfert. En ce qui concerne les résultats sur 15 g, les courbes confirment que les conditions dynamiques extraient plus qu'en statique, ce qui était déjà le cas sur une charge de 30 g. Par contre, le ralentissement de la cinétique après 1 kg de fluide passé (mode dynamique) est plus marqué, ce qui peut traduire un début d'appauvrissement de la matrice. En termes d'extrapolation du procédé, poursuivre l'extraction au delà de 1,2 kg de fluide en consommant 0,8 kg supplémentaire ne générera que 1,5g d'extrait supplémentaire, ce qui est peu comparés aux 5,5 g générés jusqu'à 1,2 kg de fluide.

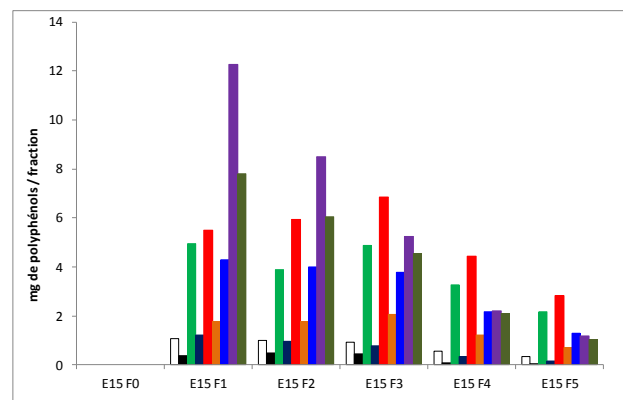
Les Figures 94 et 95 représentent le profil en polyphénols de chaque fraction dans le cas des extractions à partir de 55 g et 15 g de matrice en mode statique (respectivement EFS 19 et EFS 15). Sur une faible charge, un maximum de polyphénols est extrait dès F1 alors qu'à partir de 55 g, la fraction F4 est toujours riche en composés phénoliques sans qu'aucune décroissance de la quantité extraite ne soit encore perçue.



**Figure 93 :** Effet de la quantité de matrice chargée sur la quantité globale extraite par EFS en dynamique ou statique (15 g, 30 g, 55 g sur pelures de pommes broyées) à 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH,  $F_{total} = 9,7 \pm 0,8$  g/min. ▲ EFS 12 - dynamique 15 g, ● EFS 9/11 - dynamique 30 g, △ EFS 15 - statique 15 g, ○ EFS 13/14 - statique 30 g, □ EFS 19 - statique 55 g. (n=2, écart à la moyenne)



**Figure 94 :** Profil phénolique dans les fractions collectées durant EFS 19 à 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH ( $F_{total} = 9,7 \pm 0,8$  g/min), procédure statique, 55 g de pelures de pommes lyophilisées broyées. □ Catéchine, ■ Acide chlorogénique, ■ Epicatéchine, ■ Phloridzine, ■ Quercétine-glucoside, ■ Quercétine-galactoside, ■ Quercétine-arabinoside, ■ Quercétine-xyloside (éq. Q-Ara), ■ Quercétine-rhamnoside (éq. Q-Ara).

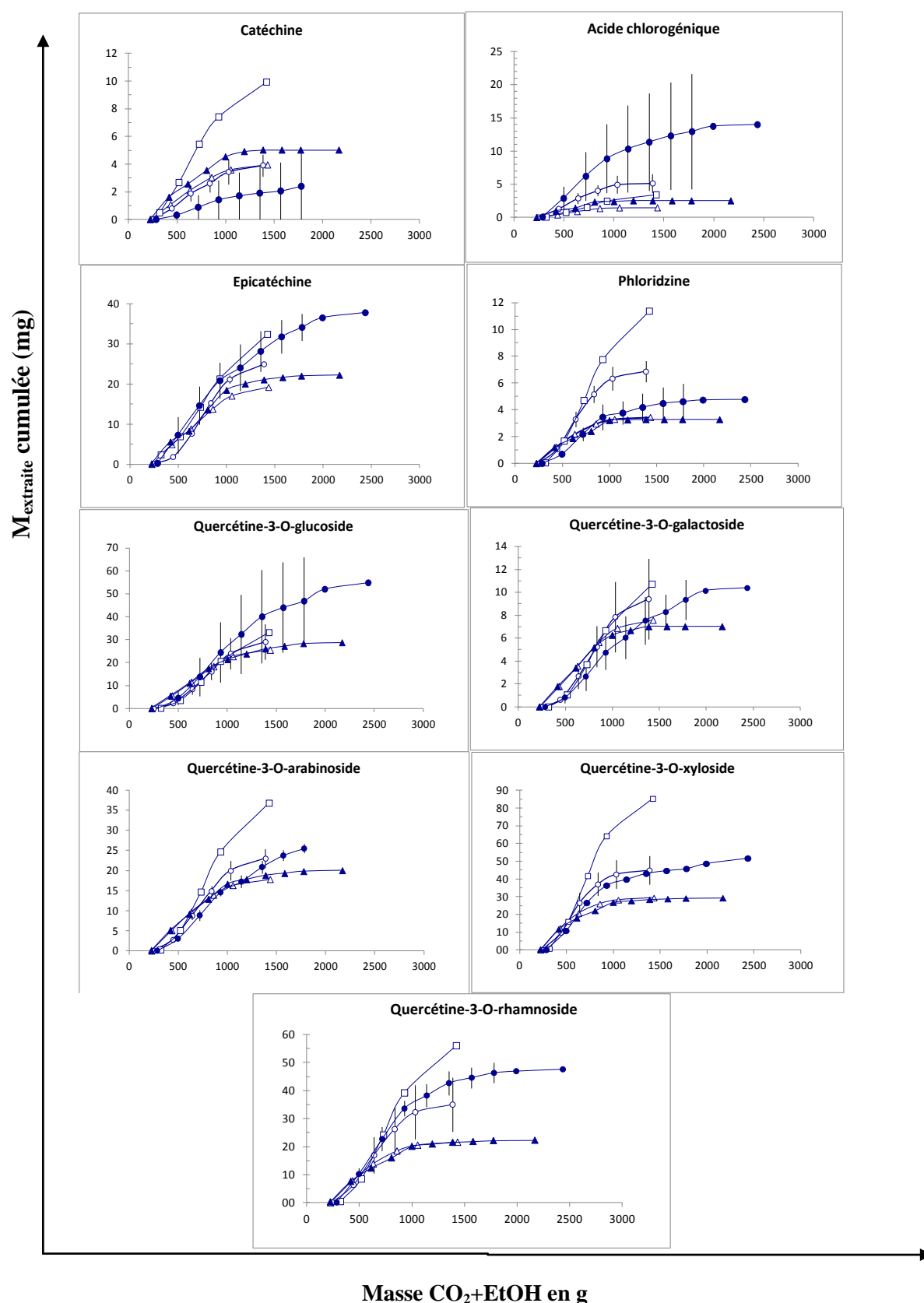


**Figure 95 :** Profil phénolique dans les fractions collectées durant EFS 15 à 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH ( $F_{total} = 9,7 \pm 0,8$  g/min), procédure statique, 15 g de pelures de pommes lyophilisées broyées. □ Catéchine, ■ Acide chlorogénique, ■ Epicatéchine, ■ Phloridzine, ■ Quercétine-glucoside,

■ Quercétine-galactoside, ■ Quercétine-arabinoside, ■ Quercétine-xyloside (ég. Q-Ara), ■ Quercétine-rhamnoside (ég. Q-Ara).

Si nous nous intéressons maintenant aux cinétiques d'extraction de chaque polyphénol (Figure 96), nous constatons que la charge de 15 g permet d'atteindre un plateau, visible dans les conditions dynamiques quand l'extraction se poursuit plus longtemps. Sur cette charge, le mode opératoire (statique vs dynamique) n'a pas d'influence puisque les courbes "statique" et "dynamique" sont du même ordre de grandeur. Le taux d'extraction décroît notablement après 1,1 kg jusqu'à 1,8 kg de fluide, soit un ratio solvant/matrice de 120, pour lequel l'extraction de presque tous les polyphénols est globalement terminée. Dans ces conditions, la quantité totale de polyphénols extraits est de l'ordre de 140 mg. A 1,1 kg de fluide, au moment du fléchissement du taux d'extraction, la quantité est déjà de 120 mg, ce qui en termes de rendement d'extraction exprimé par le ratio Qpolyphénols/100g de charge donne la plus grande valeur de 0,8 g de polyphénols/100 g de pelures lyophilisées (Tableau 24). A cette valeur de 1,1 kg de fluide passé, et quelque soit le protocole, les extraits sont principalement composés par de l'épicatéchine et des dérivés de quercétine (Tableau 24), le pool de dérivés quercétine comptant pour 76-79 %. A l'inverse, la charge de 55 g (EFS 19) conduit au plus faible ratio de polyphénols/100 g de charge (0,3 g/100g), mais c'est aussi l'essai réalisé avec le plus faible ratio solvant/charge, soit un ratio de 20 contre 37 ou 73 pour les autres essais (Tableau 24).





**Figure 96 :** Quantité extraite de chaque polyphénol en fonction de la charge traitée, en dynamique ou statique (15 g, 30 g, 55 g de pelures lyophilisées broyées) à 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH (F<sub>total</sub> = 9,7 ± 0,8 g/min) ▲ EFS 12 - dynamique 15 g, ● EFS 9/11 - dynamique 30 g, △ EFS 15 - statique 15 g, ○ EFS 13/14 - statique 30 g, □ EFS 19 - statique 55 g. (n=2, écart à la moyenne)

**Tableau 24 :** Rendement des composés phénoliques extraits pour chacune des conditions : statique 55 g - EFS 19, statique 30 g - EFS 13/14, statique 15 g - EFS 15, dynamique 30 g - 9/11, dynamique 15 g - EFS 12, sur des épidermes de pommes Golden. (n=2, écart à la moyenne)

Méthode	EFS 19 - statique 55g	EFS 13/14 - statique 30g	EFS 15 - statique 15g	EFS 9/11 - dynamique 30g	EFS 12 - dynamique 15g
Solvant (mol)	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 76:21:03	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 75:22:03	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 75:22:03	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 75:22:03	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 75:22:03
Ratio solvant/pelures <sup>a</sup>	20	37	73	37	73
T / P	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa
Rendement global <sup>a</sup> (g/100g pelures sèches <sup>d</sup> )	10,2	15,8 ± 0,2	25,4	22,0 ± 0,7	48,9
Quantité de polyphénols <sup>a</sup> (mg/100g de pelures sèches <sup>d</sup> )					
Polyphénols totaux	353,4	550 ± 115	800	603 ± 182	851,0
Catéchine	13,5	11,4 ± 2,3	23,9	6,0 ± 6,0	32,7
Acide chlorogénique	4,5	16,4 ± 4,5	9,7	36,2 ± 23,0	16,7
Épicatéchine	38,8	71,6 ± 3,4	113,5	78,7 ± 11,4	133,6
Phloridzine	14,1	21,5 ± 3,0	22	13,2 ± 3,0	21,7
Quercétine-3-glucoside	37,4	81,2 ± 23,0	151,7	113,7 ± 60,4	158,6
Quercétine-3-galactoside	12,1	26,5 ± 10,4	45,7	21,2 ± 5,7	44,5
Quercétine-3-arabinoside	44,9	67,6 ± 8,3	108,8	54,6 ± 5,7	118,7
Quercétine-3-xyloside <sup>b</sup>	116,9	144,5 ± 27,5	188,2	139,8 ± 14,2	184,8
Quercétine-3-rhamnoside <sup>b</sup>	71,2	109,3 ± 32,8	136,9	134,2 ± 46,4	139,7
Concentration en polyphénols totaux (g polyphénols/kg extrait)	34,8	34,7	31,5	27,4	17,4

<sup>a</sup> pour 1,1 kg de fluide extractant FSC

<sup>b</sup> exprimé en équivalent quercétine-arabinoside

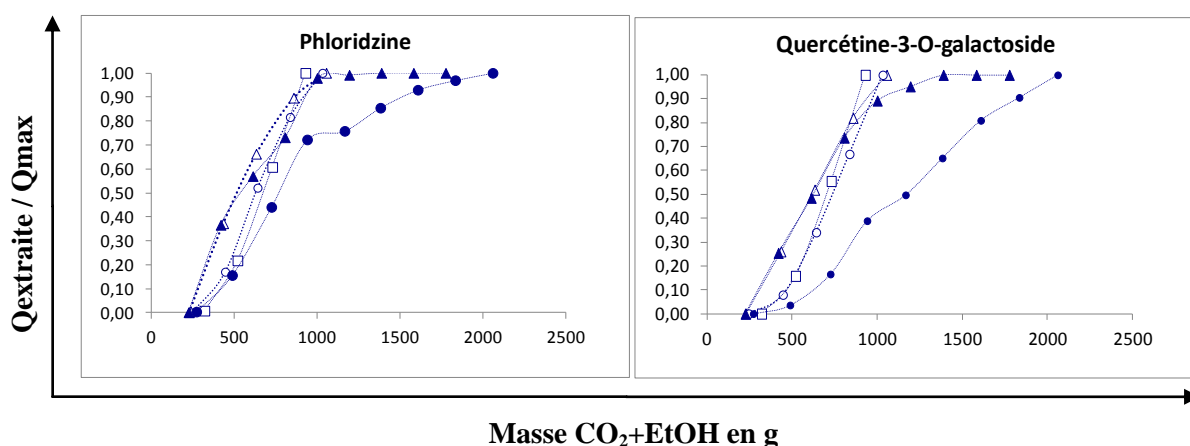
<sup>c</sup> données correspondant à une moyenne entre les résultats statique et dynamique quand ils sont similaires.

<sup>d</sup> pelures sèches = pelures lyophilisées contenant 5-7% d'humidité

Les courbes d'extraction de chaque phénol et à leur sensibilité à la charge sont présentées Figure 96. Sur les 3 premières fractions (jusqu'à 0,5 à 0,7 kg de fluide), toutes les cinétiques sont du même ordre malgré une procédure et/ou une charge différente. Au-delà de cette valeur, les polyphénols ne répondent pas de la même façon à l'augmentation de la charge. Dans les conditions statiques, plus reproductibles que les conditions dynamiques, les quercétines-glucoside et -galactoside sont faiblement affectées, alors que les quantités extraites des autres dérivés de quercétine, de l'épicatéchine et de la phloridzine sont plus régulièrement augmentées. L'acide chlorogénique a un comportement différent avec une quantité extraite plus faible à partir de 55 g qu'à 30 g. Dans les conditions dynamiques et pour les composés ayant des données les plus reproductibles (quercétine -xyloside, -arabinoside, épicatéchine), les quantités extraites augmentent avec la charge (au delà d'une masse de fluide passée supérieure à 1,1 kg de fluide).

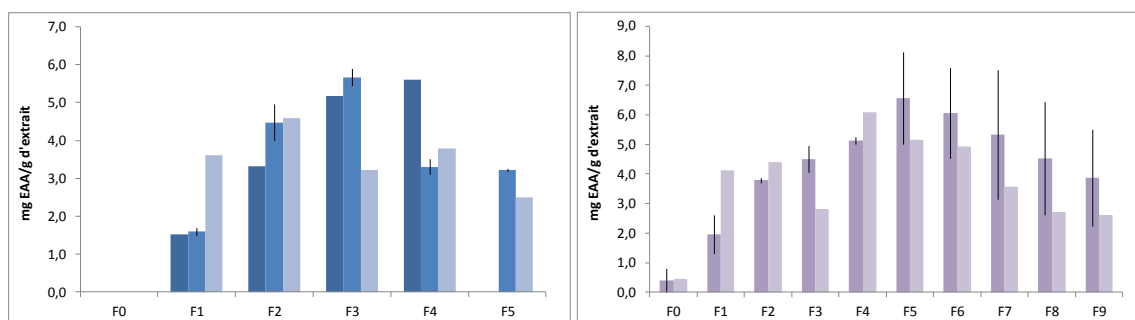
Ces essais ont été réalisés avec le même lot de pomme (lot n°1) donc il n'y a pas de variabilité provenant des polyphénols totaux dans les matrices pommes initiales, hormis celle provenant des pommes elles mêmes qui ont constitué le lot. Pour niveler la variabilité des teneurs

initiales et discuter ainsi de l'effet d'un paramètre opératoire en termes cette fois-ci de vitesses d'extraction, les données précédentes sont représentées en les normalisant par la quantité extraite à l'avant dernier point, soit en portant  $Q_{cumulée}$  à l'instant où masse de fluide donné /  $Q_{cumulée}$  max (Figure 97) (courbe présentée pour la phloridzine et la quercétine–galactoside, les courbes des autres composés sont en annexe Figure 151). Globalement, les vitesses d'extraction sont similaires pour toutes les conditions à l'exception du mode dynamique 30 g, qui est plus lent par rapport aux autres conditions. Une extraction dynamique sur 30 g de charge apparaît donc comme la condition la moins efficace.



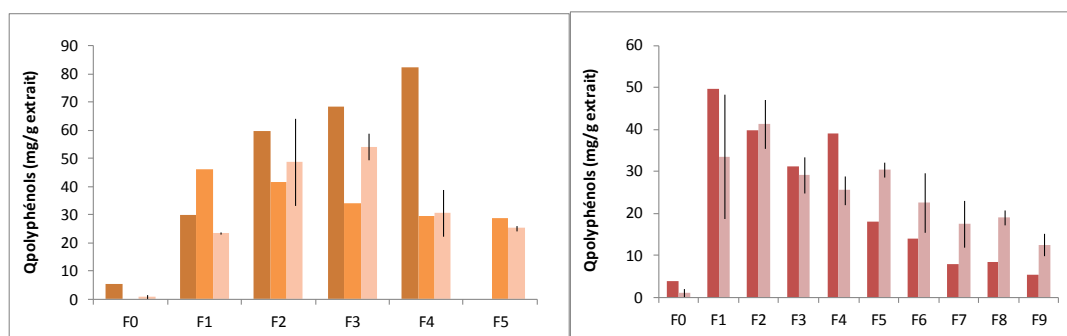
*Figure 97 : Cinétique normalisée d'extraction des polyphénols à 25 MPa, 50 °C et  $CO_2+25\%$  EtOH ( $F_{total} = 9,7 \pm 0,8$  g/min) ▲ EFS 12 - dynamique 15 g, ● EFS 9/11 - dynamique 30 g, △ EFS 15 - statique 15 g, ○ EFS 13/14 - statique 30 g, □ EFS 19 - statique 55 g. Les autres courbes de polyphénols sont présentées en annexe Figure 151.*

Tous les essais présentés dans ce paragraphe ont été réalisés avec le même lot de pommes, ce qui signifie que nous pouvons comparer les capacités antioxydantes des extraits ainsi que leur quantité de polyphénols totaux. Les profils de capacité antioxydante des EFS 15 g, 30 g et 55 g en statique sont corrélés avec leurs profils de polyphénols extraits (Figures 98 et 99).



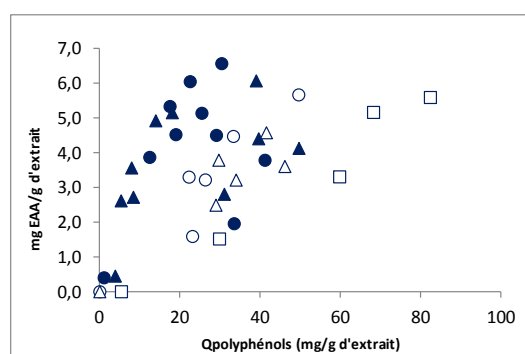
*Figure 98: Capacité antioxydante exprimée en équivalent acide ascorbique (mg EAA/g d'extrait sec) pour chaque fraction (pelures broyées, 25 MPa, 50 °C et  $CO_2+25\%$  EtOH,) ■ EFS 19 - statique 55 g,*

■ EFS 13/14 - statique 30 g, ■ EFS 15 - statique 15 g, ■ EFS 9/11 - dynamique 30 g, ■ EFS 12 - dynamique 15 g. (n=2, écart à la moyenne)



**Figure 99:** Quantité de polyphénols en mg/g d'extrait pour ■ EFS 19 - statique 55 g, ■ EFS 15 - statique 15 g, ■ EFS 13/14 - statique 30 g, ■ EFS 12 - dynamique 15 g, ■ EFS 9/11 - dynamique 30 g (pelures broyées, 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH). (n=2, écart à la moyenne)

En conditions statiques pour les charges de 15 g et 30 g, la capacité antioxydante maximale est retrouvée dans les fractions ayant le plus de polyphénols, soient respectivement F1/F2 et F2/F3 pour EFS 15 et EFS 13/14. Les polyphénols analysés contribuent bien à l'activité antioxydante mesurée avec respectivement  $r^2 = 0,848$ ,  $r^2 = 0,898$  et  $r^2 = 0,965$  pour EFS 15, EFS 13/14 et EFS 19 (Figure 100), corrélation qui est spécifiquement attribuée à la teneur en dérivés quercétines (Figure 101), notamment dans le cas de la charge de 55 g ( $r^2 > 0,9$ ). Pour le mode dynamique, les profils entre le pouvoir antioxydant et la quantité de polyphénols ne correspondent pas. Effectivement, la quantité de polyphénols décroît de F1 à F9 alors que la capacité antioxydante augmente des fractions F1 à F4/F5 puis diminue. Dans les tests de corrélations (Figures 100 et 101) les points sont trop dispersés. Ses résultats signifieraient que les molécules responsables de la capacité antioxydante ne sont pas uniquement les polyphénols quantifiés. Ces résultats corroborent avec ceux observés précédemment.



**Figure 100:** Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur de polyphénols (mg/g d'extrait sec) dans chaque fraction obtenue par ▲ EFS 12 - dynamique 15 g, ● EFS 9/11 - dynamique

30 g,  $\Delta$  EFS 15 - statique 15 g,  $\circ$  EFS 13/14 - statique 30 g,  $\square$  EFS 19 - statique 55 g (25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH).

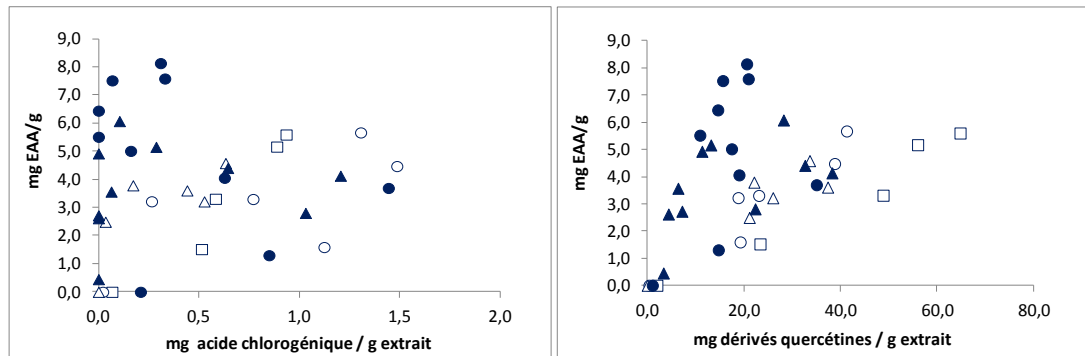


Figure 101 : Tests de corrélation entre la capacité antioxydante en mg EAA/g d'extrait sec et la teneur en acide chlorogénique (mg/g) ou en dérivés quercétine (mg/g):  $\blacktriangle$  EFS 12 - dynamique 15 g,  $\bullet$  EFS 9/11 - dynamique 30 g,  $\Delta$  EFS 15 - statique 15 g,  $\circ$  EFS 13/14 - statique 30 g,  $\square$  EFS 19 - statique 55 g (25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH).

#### I.4. Influence de la préparation de la poudre de pommes

##### I.4.1. Broyage des épidermes de pommes

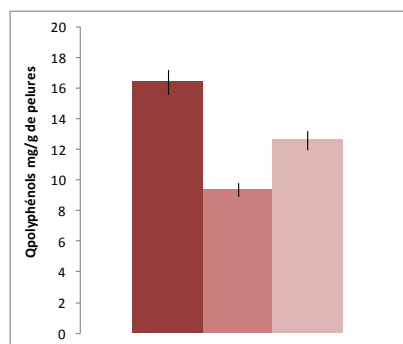
Pour les essais précédents, dénommés ici "broyage fin", les épidermes de pommes lyophilisés avaient été broyés avec un moulin à café type blender (Moulinex, France). La poudre obtenue n'est pas tamisée, elle se compose de grains polydisperses de tailles inférieures à 1 mm. Pour l'échantillon "grossier", les épidermes de pommes lyophilisés ont été simplement découpés avec une paire de ciseaux et forment des morceaux  $\geq 4$  mm. Le descriptif des extractions est présenté Tableau 25. Le tableau met en évidence que les extractions ont été réalisées à partir d'épidermes provenant de 3 lots de pommes différents (lot n°1, 2 et 3).

Tableau 25 : Paramètres des essais EFS réalisés pour étudier l'influence du broyage des épidermes.

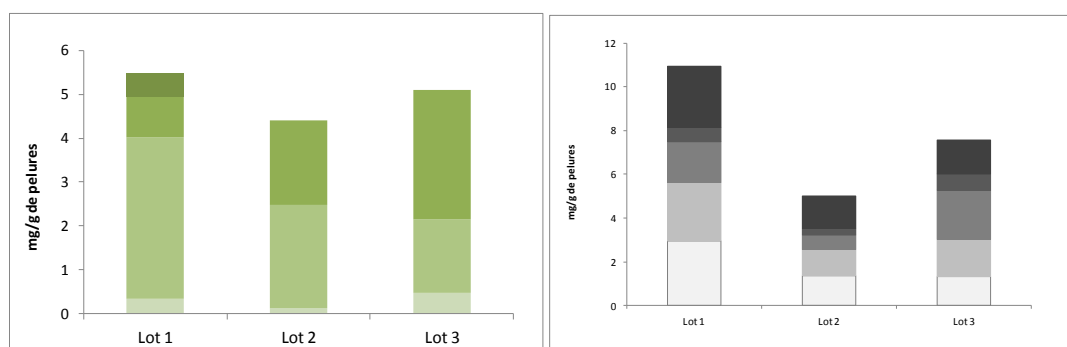
EFS	Charge	T°	Broyage épidermes	Protocole	Composition %mol (CO <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O)	Nombre de fractions	M <sub>totale</sub> extraite	M <sub>fluide</sub>	Lot pommes
EFS 13/14	29,5 $\pm$ 0,5 g	50°C	fin	statique	74,4 $\pm$ 1,4 : 22,5 $\pm$ 1,2 : 3 $\pm$ 0,1	F0 à F5	5,27 $\pm$ 0,15 g	1386 $\pm$ 137 g	1
EFS 26	28,7 g	50°C	grossier	statique	73,6 : 23,2 : 3,2	F0 à F5	4,53 g	1627 g	3
EFS 9/11	28,5 $\pm$ 1,5 g	50°C	fin	dynamique	76,4 $\pm$ 1 : 20,8 $\pm$ 0,8 : 2,8 $\pm$ 0,1	F0 à F9	10,3 $\pm$ 1 g	2436 $\pm$ 60 g	1
EFS 23	28,8 g	50°C	grossier	dynamique	71 : 25,5 : 3,5	F0 à F7	6,39 g	1726 g	2

Lors de la synthèse et de la discussion des résultats de cette série, il s'est avéré que les échantillons non broyés produisaient des quantités de polyphénols extraits beaucoup plus faibles, qui peut être expliqué par un transfert de matière plus lent. Nous avons donc analysé les matières premières des trois lots de pommes *Golden* collectés à différentes périodes. Les 3 lots contiennent

des quantités de polyphénols totaux (Figure 102) et de classes polyphénoliques variables (Figure 103). Le lot n°2 de matière première contient significativement moins de polyphénols que les lots n°1 et n°3. D'une façon globale, les lots n°2 et n°3 ne contiennent pas de catéchine mais davantage d'acide chlorogénique que le lot de pommes n°1. Ces variables devront être prises en compte dans l'interprétation des résultats.



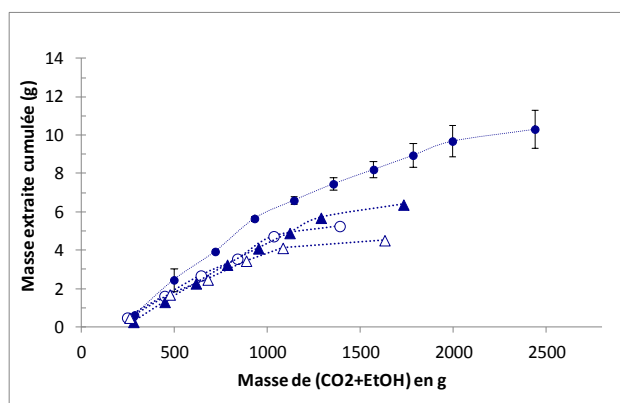
**Figure 102 :** Quantités de polyphénols totaux obtenues par dosage Folin-Ciocalteu des épidermes de pommes Golden constituant les lots: ■ Lot n°1, ■ Lot n°2 et ■ Lot n°3.(n=15, écart type)



**Figure 103 :** Composition en polyphénols (mg/g) des lots de pommes Golden : ■ Catéchine, ■ Acide chlorogénique, ■ Epicatéchine, ■ Phloridzine, ■ Quercétine-glucoside, ■ Quercétine-galactoside, ■ Quercétine-arabinoside, ■ Quercétine-xyloside (ég. Q-Ara), ■ Quercétine- rhamnoside (ég. Q-Ara).

Les courbes de quantités extraites globale et pour chaque polyphénol sont données Figures 104 et 105, tandis que le Tableau 26 rassemble les principaux résultats quantitatifs.

D'après la Figure 104, le broyage n'influe pas sur la masse globale extraite quand les extractions sont conduites en protocole statique, alors qu'en mode dynamique, davantage de matière sont extraites à partir de grains broyés. Pour les polyphénols, les différences sont très nettement marquées, ce qui nous a conduit à considérer le problème des lots différents.



**Figure 104 :** Influence du broyage sur les masses globales extraites cumulées ( $\text{CO}_2$ +25 % EtOH à 25 MPa, 50 °C, en mode dynamique ou statique sur 30 g d'épidermes broyés grossièrement ou finement. Les écarts à la moyenne pour l'échantillon broyé finement en statique sont trop petits pour être visibles. ● EFS 9/11 - dynamique fin, ○ EFS 13/14 - statique fin, ▲ EFS 23 - dynamique grossier, △ EFS 26 - statique grossier. (n=2)

**Tableau 26 :** Rendement des composés phénoliques extraits pour chacune des conditions statique broyage fin - EFS 13/14, statique broyage grossier – EFS 26, dynamique broyage fin – EFS 9/11, dynamique broyage grossier - EFS 23, sur des épidermes de pommes Golden (50 °C, 25 MPa).(n=2, écart à la moyenne)

Méthode	EFS 13/14 - statique broyage fin	EFS 26 - statique broyage grossier	EFS 9/11 - dynamique broyage fin	EFS 23 - dynamique broyage grossier
Solvant (mol)	$\text{CO}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ 75:22:03	$\text{CO}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ 74:23:03	$\text{CO}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ 75:22:03	$\text{CO}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ 71:25:03
Ratio solvant/pelures <sup>a</sup>	37	38	37	38
T / P	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa
Rendement global <sup>a</sup> (g/100g pelures sèches <sup>d</sup> )	15,8 ± 0,2	15,8	22,0 ± 0,7	22,2
Quantité de polyphénols <sup>a</sup> (mg/100g de pelures sèches <sup>d</sup> )				
Polyphénols totaux	550 ± 115	221	603 ± 182	149
Catéchine	11,4 ± 2,3	0	6,0 ± 6,0	0,5
Acide chlorogénique	16,4 ± 4,5	8,2	36,2 ± 23,0	19,9
Epicatéchine	71,6 ± 3,4	28,3	78,7 ± 11,4	35,4
Phloridzine	21,5 ± 3,0	4,2	13,2 ± 3,0	2
Quercétine-3-glucoside	81,2 ± 23,0	48,8	113,7 ± 60,4	24,2
Quercétine-3-galactoside	26,5 ± 10,4	10,7	21,2 ± 5,7	3,7
Quercétine-3-arabinoside	67,6 ± 8,3	22,2	54,6 ± 5,7	11,3
Quercétine-3-xyloside <sup>b</sup>	144,5 ± 27,5	49,9	139,8 ± 14,2	25,2
Quercétine-3-rhamnoside <sup>b</sup>	109,3 ± 32,8	48,7	134,2 ± 46,4	26,2
Concentration en polyphénols totaux (g polyphénols/kg extrait)	34,7	13,9	27,4	6,7

<sup>a</sup> pour 1,1 kg de fluide extractant EFS

<sup>b</sup> exprimé en équivalent quercétine-3-arabinoside

<sup>c</sup> données correspondant à une moyenne entre les résultats statique et dynamique quand ils sont similaires

<sup>d</sup> pelures sèches = pelures lyophilisées contenant 5-7% d'humidité

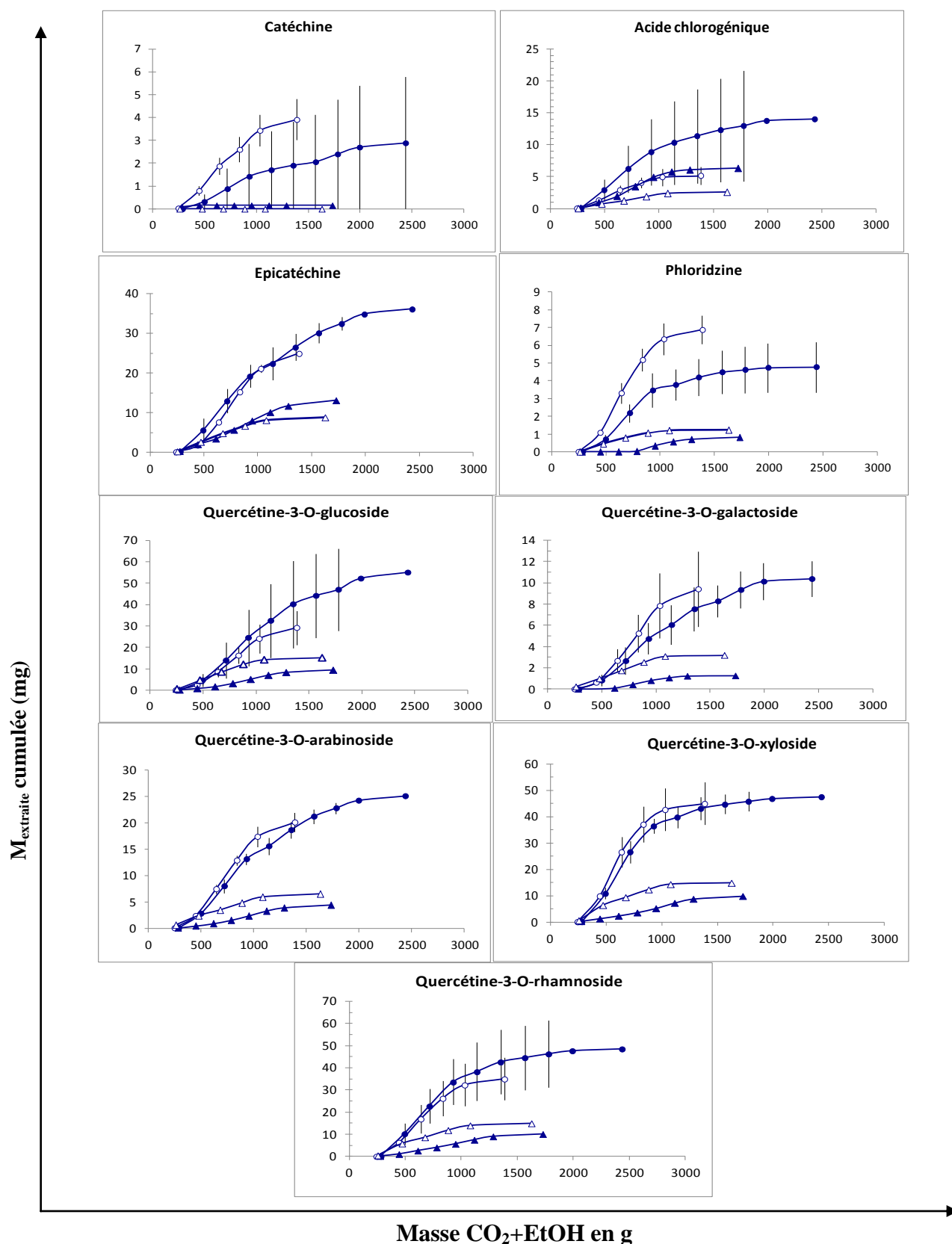
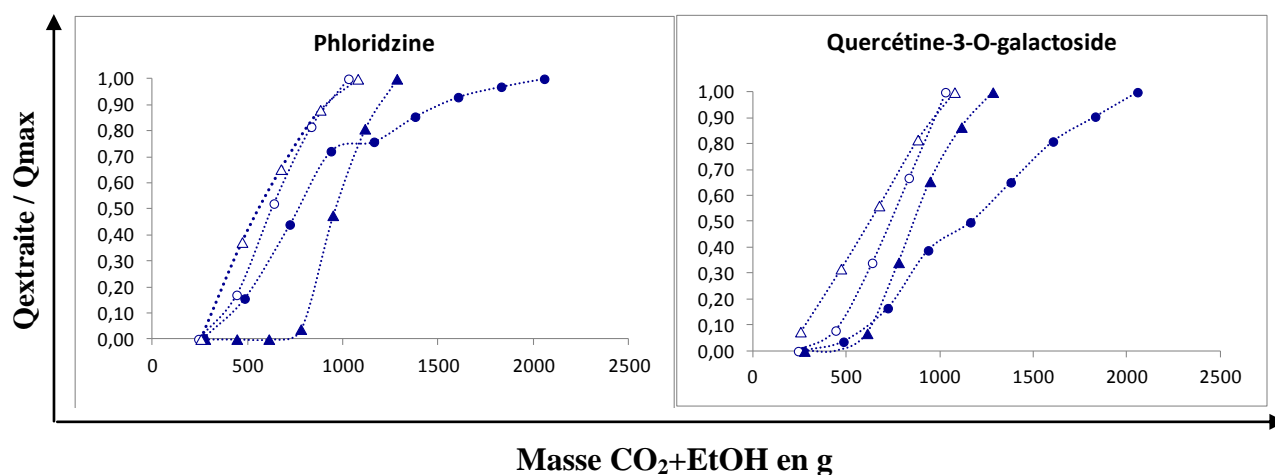


Figure 105 : Masses extraites cumulées de chacun des polyphénols en fonction de la masse de fluide CO<sub>2</sub>+25 % EtOH à 25 MPa, 50 °C, sur 30 g de pelures. ● EFS 9/11 - dynamique fin, ○ EFS 13/14 - statique fin, ▲ EFS 23 - dynamique grossier, △ EFS 26 - statique grossier. (n=2, écart à la moyenne)



D'une façon générale, obtenir une masse extraite nettement plus faible à partir de grains grossiers par rapport à des grains fins n'est pas surprenant. En effet, dans le cas de grains au sein desquels les molécules extractibles sont réparties, le broyage permet de diminuer la distance sur laquelle l'espèce doit diffuser dans la particule et d'augmenter la surface d'échange entre la particule et le fluide extractant, conduisant ainsi à une quantité extraite par unité de temps (ou par masse de fluide) plus importante, ce qui est observé ici. C'est également observé pour la matière globale extraite et de façon plus notable avec le protocole dynamique. Néanmoins, pour un épiderme de pomme qui constitue déjà une couche peu épaisse sur le parenchyme sous-jacent, il est surprenant que le broyage améliore autant l'extraction des polyphénols qui sont essentiellement concentrés dans l'épiderme. Pour la matière globale, nous pouvons admettre que l'échantillon contient toujours une partie de parenchyme qui contribue aux molécules extractibles, le broyage va effectivement exposer plus de surfaces au fluide extractant. Cependant, pour la fine couche de l'épiderme, c'est à dire pour des molécules déjà localisées en périphérie de la particule, le broyage ne devrait que peu modifier la surface d'échange, sauf si d'autres paramètres sont à prendre en compte comme la variabilité de lot. La faible quantité des polyphénols extraits (Tableau 26) est cohérente avec la teneur initial des lots, le lot n°2 par exemple présentant la plus faible teneur initiale aux environs de 9 mg/g de pelures conduit à la faible quantité de polyphénols extraits de 149 mg/100g de pelures alors que le lot n°3, avec une teneur initiale voisine de 12 mg/g produit 221 mg/100g de polyphénols. Par contre, à partir du moment où la masse globale extraite ne dépend ni du broyage, ni *à fortiori* du lot, la faible teneur initiale et/ou la granulométrie grossière pénalisent la "pureté" de l'extrait produit, puisque seulement 6 à 14 g de polyphénols par kg d'extrait sont récupérée, contre 27-34 g/kg pour les extractions menées sur le lot n°1 et un broyage fin (Tableau 26).

Afin de pouvoir interpréter le rôle du broyage indépendamment de la teneur initiale en polyphénols, les courbes d'extraction sont représentées sous une forme normalisée (Figure 106) que nous commentons en termes de vitesse d'extraction : le point terminal est-il plus rapidement atteint en fonction du broyage ? Les représentations données ici pour deux des polyphénols (Figure 106) et présentées en Annexe Figure 152 pour les autres mettent en évidence une extraction plus efficace dans le cas d'un broyage grossier et un protocole statique (EFS 26). Il semblerait donc que les polyphénols situés à la périphérie de la particule soient extraits directement et plus facilement et/ou qu'il y ait moins de chemins préférentiels du fluide avec un lit de particules grossières. A l'inverse, nous pouvons envisager qu'une taille de grain plus fin sature immédiatement le fluide et rend donc l'extraction des minoritaires tels que les polyphénols moins efficace. Nos résultats normalisés sont cohérents avec les travaux de Rui *et al.* (2002) qui mettent en évidence une amélioration du rendement avec l'augmentation de la taille des particules, sans pour autant avancer une interprétation.



**Figure 106:** Cinétiques normalisées d'extraction de deux polyphénols (CO<sub>2</sub>+25 % EtOH à 25 MPa, 50 °C, sur 30 g de pelures) en fonction des conditions de broyage. ● EFS 9/11 - dynamique fin, ○ EFS 13/14 - statique fin, ▲ EFS 23 - dynamique grossier, △ EFS 26 - statique grossier. Les autres polyphénols sont présentés en annexe Figure 152.

#### I.4.2. Blanchiment de la matière première

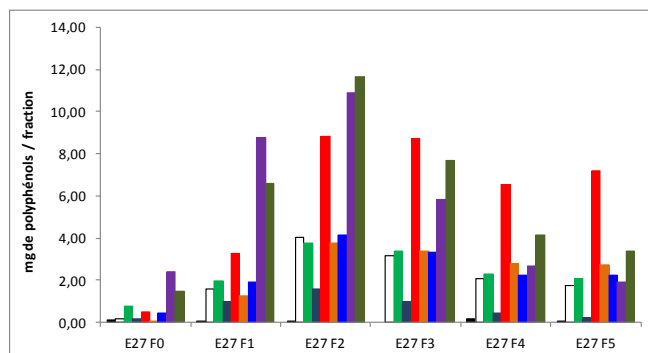
En agroalimentaire, le blanchiment est l'application d'un traitement thermique sur la matière végétale fraîche pour stopper le brunissement enzymatique en inactivant les enzymes PPO et POD par la chaleur. Le blanchiment a ici été appliqué sur les pelures de pommes fraîches à 80 °C pendant 10 min puis les épidermes ont été lyophilisés. Ces échantillons blanchis ont été extraits en mode dynamique et en mode statique. Plusieurs auteurs (Vega-Galvez 2012, Lopez 2010, Kuljarachanan 2009) ne mettent pas en évidence de dégradation des polyphénols totaux et de l'activité antioxydante de matrices végétales à des températures de 80-90 °C.

Le Tableau 27 présente les données de chaque extraction. Nous pouvons voir que les conditions ne sont pas parfaitement reproductibles, avec d'une part la composition en fluide qui a varié jusqu'à +8 % de cosolvant entre EFS 27 et les autres EFS, et d'autre part des lots différents entre les épidermes blanchis et les non blanchis (le lot n°3 à partir duquel a été réalisé le blanchiment contient globalement moins de polyphénols).

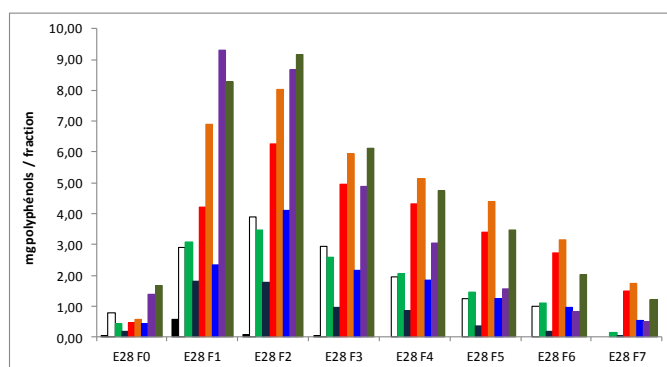
**Tableau 27:** Paramètres des extractions « impact du blanchiment ».

EFS	Charge	T°	Blanchiment	Protocole	Composition %mol (CO <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O)	Nombre de fractions	M <sub>totale</sub> extraite	M <sub>fluide</sub>	Lot pommes
EFS 13/14	29,5 ± 0,5 g	50°C	non	statique	74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1	F0 à F5	5,27 ± 0,15 g	1386 ± 137 g	1
EFS 9/11	28,5 ± 1,5 g	50°C	non	dynamique	76,4 ± 1 : 20,8 ± 0,8 : 2,8 ± 0,1	F0 à F9	10,3 ± 1 g	2436 ± 60 g	1
EFS 27	30,3 g	50°C	oui	statique	67,5 : 28 : 5,4	F0 à F5	6,24 g	1188 g	3
EFS 28	30 g	50°C	oui	dynamique	71,3 : 25,2 : 3,5	F0 à F7	5,86 g	1966 g	3

En revanche, les EFS 27 et EFS 28 réalisées sur le même lot permettent à nouveau de comparer le mode statique et le mode dynamique. En termes d'évolution des profils polyphénoliques pour chaque fraction (Figures 107 et 108), une évolution similaire à celle observée est retrouvée sur les épidermes non blanchis (Figures 86 et 87). En effet, un maximum dans la distribution est présent autour de la fraction F2 quelque soit le mode, suivi d'une diminution régulière dans les fractions supérieures pour le mode dynamique alors que le mode statique accuse une décroissance moins marquée.



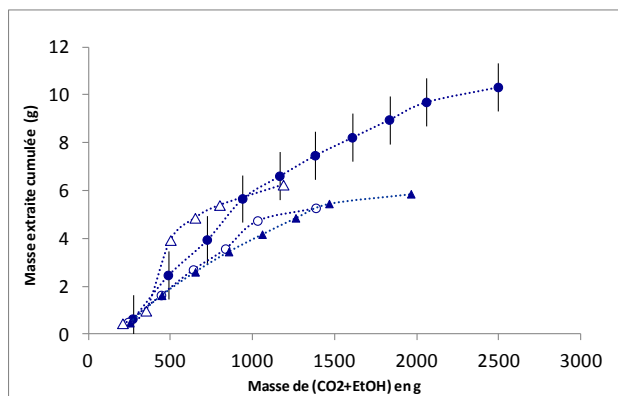
**Figure 107 :** Profil de polyphénols dans les fractions collectées EFS 27, à 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+33 % EtOH, procédure statique, 30 g de pelures de pommes blanchies lyophilisées et broyées. ■ Catéchine, □ Acide chlorogénique, ■ Epicatéchine, ■ Phloridzine, ■ Quercétine-glucoside, ■ Quercétine-galactoside, ■ Quercétine-arabinoside, ■ Quercétine-xyloside (ég. Q-Ara), ■ Quercétine-rhamnoside (ég. Q-Ara).



**Figure 108 :** Profil de polyphénols dans les fractions collectées EFS 28, à 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+29 % EtOH, procédure dynamique, 30 g de pelures de pommes blanchies lyophilisées et broyées. ■ Catéchine, □ Acide chlorogénique, ■ Epicatéchine, ■ Phloridzine, ■ Quercétine-glucoside, ■ Quercétine-galactoside, ■ Quercétine-arabinoside, ■ Quercétine-xyloside (ég. Q-Ara), ■ Quercétine-rhamnoside (ég. Q-Ara).

La masse extraite globale (Figure 109) est sensible aux conditions préalables de blanchiment même si compte tenu des reproductibilités, les cinétiques sont du même ordre de

grandeur au moins jusqu'à 1 kg de fluide. Néanmoins, sur des échantillons blanchis (symboles en triangle), la quantité extraite en mode statique est un peu plus importante que la masse obtenue par le protocole dynamique. Lors de la discussion sur l'incidence du mode, nous avons émis l'hypothèse d'une réaction compétitive à l'extraction qui pouvait conduire à une masse extraite plus faible. Nous pouvons imaginer que des réactions enzymatiques soient par exemple, inhibées par le traitement de blanchiment, permettant alors à l'extraction de retrouver un niveau plus important quand du temps est laissé à la diffusion.



*Figure 109 : Masse extraite globale ● EFS 9/11 - dynamique, ○ EFS 13/14 - statique, ▲ EFS 28 - dynamique blanchi, △ EFS 27 - statique blanchi. Les écarts à la moyenne dans la condition statique non blanchies sont trop petits pour être visibles. (n=2)*

Les données à 1,1 kg de fluide, présentées dans le Tableau 28, montrent des quantités extraites en polyphénols du même ordre de grandeur que les pelures soient blanchies ou non, sauf pour les phénols présents à des teneurs très différentes en fonction du lot.

Ainsi, à partir des matrices ayant été blanchies, la catéchine et l'épicatéchine sont plus faiblement extraits alors que les quantités d'acide chlorogénique et de quercétine-galactoside extraites sont 10 fois plus importantes (Tableau 28, Figure 108). Cependant, le lot n°3 (sur lequel est réalisé EFS 27 et EFS 28) contient plus d'acide chlorogénique que le lot n°1 (EFS 13/14 et EFS 9/11), mais deux fois moins d'épicatéchine et pas de catéchine. Les quantités de dérivés quercétine sont globalement du même ordre entre les deux lots. De faibles quantités de catéchine et d'épicatéchine extraites, ainsi qu'une masse extraite d'acide chlorogénique plus importante peuvent s'expliquer par les lots de pommes utilisés, et non par un effet du blanchiment. Seul le comportement de la quercétine-3-galactoside ne peut être expliqué par le lot.

En termes de cinétique d'extraction, qu'elles soient représentées en quantités extraites (Figure 110) ou normalisées (Figure 111), et pour les polyphénols non mentionnés précédemment, il n'y a pas d'incidence notable du blanchiment ni sur le profil ni sur la vitesse d'extraction. Les

cinétiques d'extractions des polyphénols dans les conditions blanchies ou non sont similaires. Cependant, l'extraction en dynamique non blanchi (EFS 9/11) est marqué par un ralentissement dès la fraction F4 par rapport aux autres conditions.

**Tableau 28 :** Rendement global d'extraction et quantités des polyphénols extraits pour EFS 13/14, EFS 9/11, EFS 27 et EFS 28. (n=2, écart à la moyenne)

<sup>a</sup> pour 1,1 kg de fluide extractant FSC

<sup>b</sup> exprimé en équivalent quercétine-arabinoside

<sup>c</sup> données correspondant à une moyenne entre les résultats statique et dynamique quand ils sont similaires.

<sup>d</sup> pelures sèches = pelures lyophilisées contenant 5-7% d'humidité

Méthode	EFS 13/14 - Statique	EFS 9/11 - Dynamique	EFS 27 - Statique blanchi	EFS 28 - Dynamique blanchi
Solvant (mol)	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 74,4:22,5:3,1	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 77,4:20:2,7	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 67,5:28:5,4	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 71,3:25,2:3,5
Ratio solvant/pelures <sup>a</sup>	37	37	36	35
T / P	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa	50°C / 25 Mpa
Rendement global <sup>a</sup> (g/100g pelures sèches <sup>d</sup> )	15,8 ± 0,2	21,4	20,6	13,3
Quantité de polyphénols <sup>a</sup> (mg/100g de pelures sèches <sup>d</sup> )				
Polyphénols totaux	550 ± 115	422	542	481
Catéchine	11,4 ± 2,3	11,4	1,1	2,2
Acide chlorogénique	16,4 ± 4,5	12,5	42,1	39,8
Epicatechine	71,6 ± 3,4	60,9	46,9	37,2
Phloridzine	21,5 ± 3,0	15,5	14,4	17,8
Quercétine-3-glucoside	81,2 ± 23,0	50,7	115,7	64,6
Quercétine-3-galactoside	26,5 ± 10,4	13,9	46,1	84,9
Quercétine-3-arabinoside	67,6 ± 8,3	54,3	53,1	52
Quercétine-3-xyloside <sup>b</sup>	144,5 ± 27,5	119,3	106,9	87,2
Quercétine-3-rhamnoside <sup>b</sup>	109,3 ± 32,8	83,4	115,2	95,8
Concentration en polyphénols totaux (g polyphénols/kg extrait)	34,7	19,7	26,3	25,6

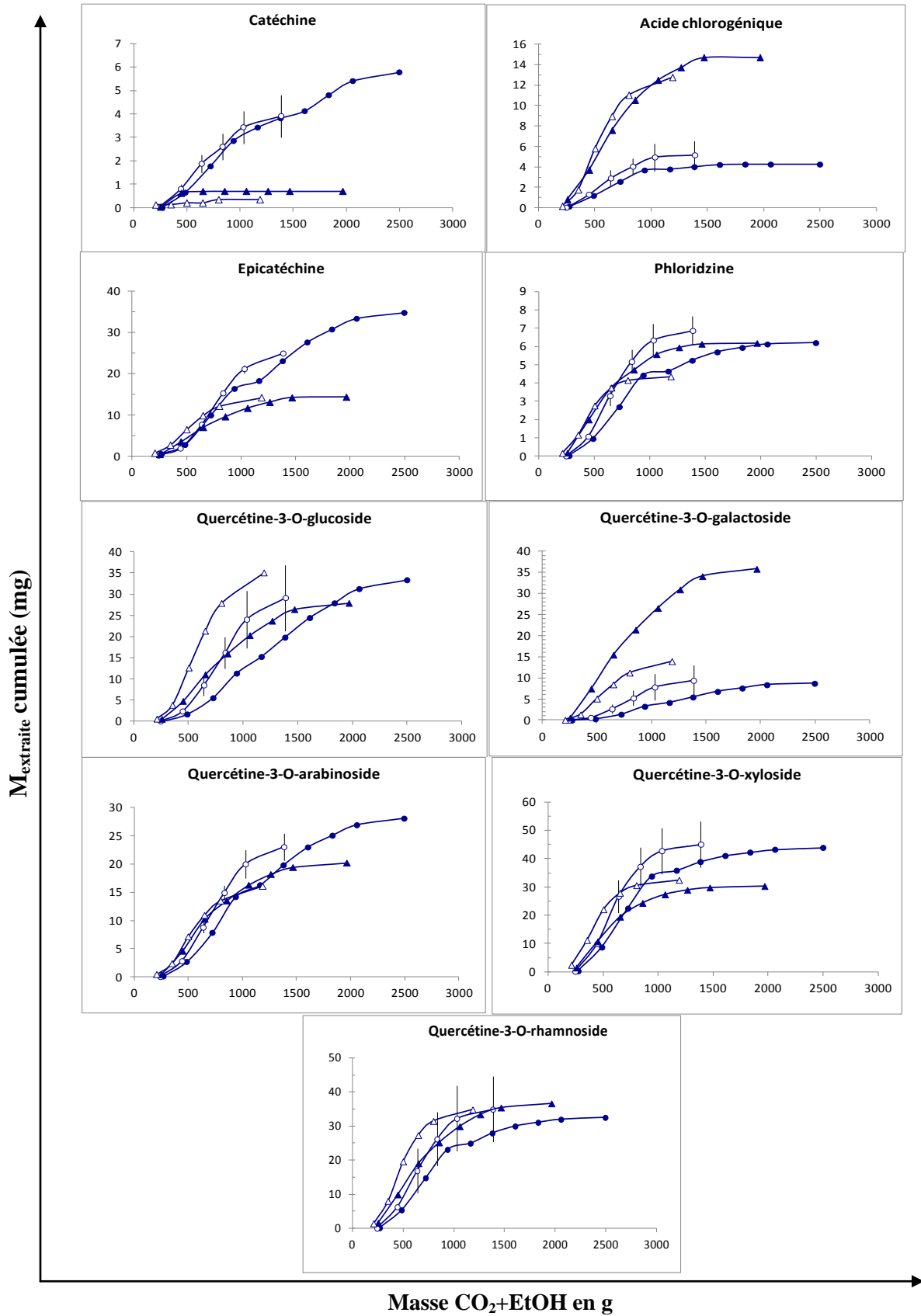
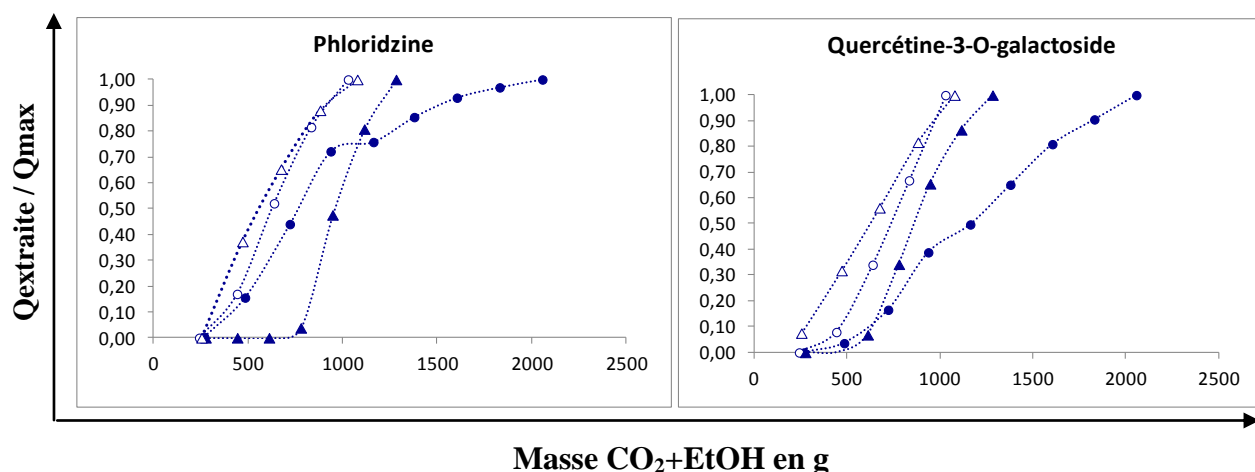
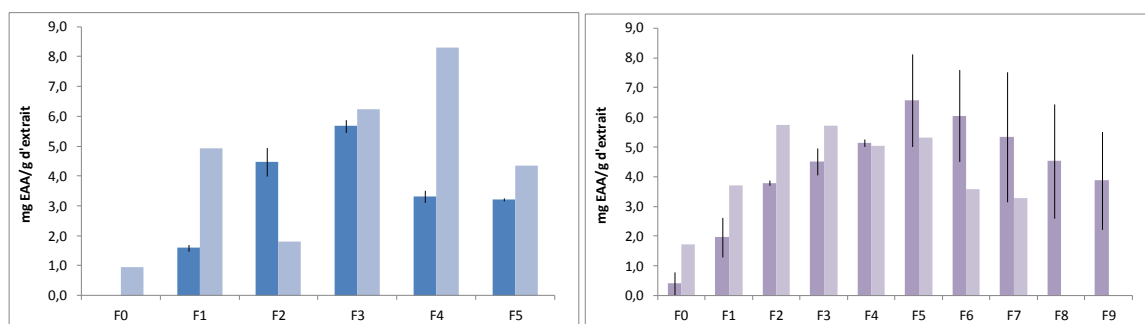


Figure 110 : Masses extraites cumulées des polyphénols (25 MPa, 50 °C et  $\text{CO}_2 + 25\% \text{ EtOH}$ , 30 g d'épidermes de pommes) ● EFS 9/11 - dynamique, ○ EFS 13/14 - statique, ▲ EFS 28 - dynamique blanchi, △ EFS 27 - statique blanchi. ( $n=2$ , écart à la moyenne)

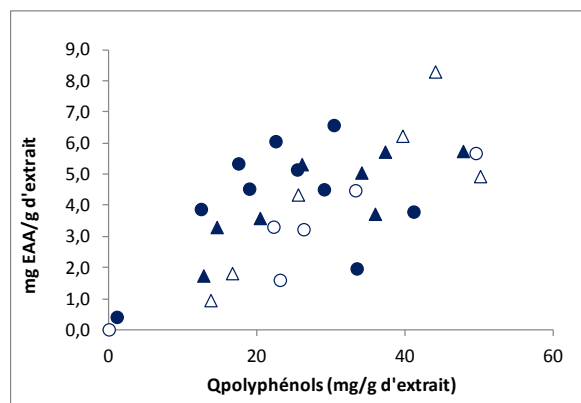


**Figure 111 :** Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols (25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH, 30 g d'épidermes de pommes) ● EFS 9/11 - dynamique, ○ EFS 13/14 - statique, ▲ EFS 28 - dynamique blanchi, △ EFS 27 - statique blanchi. Les autres courbes sont présentées en annexe Figure 153.

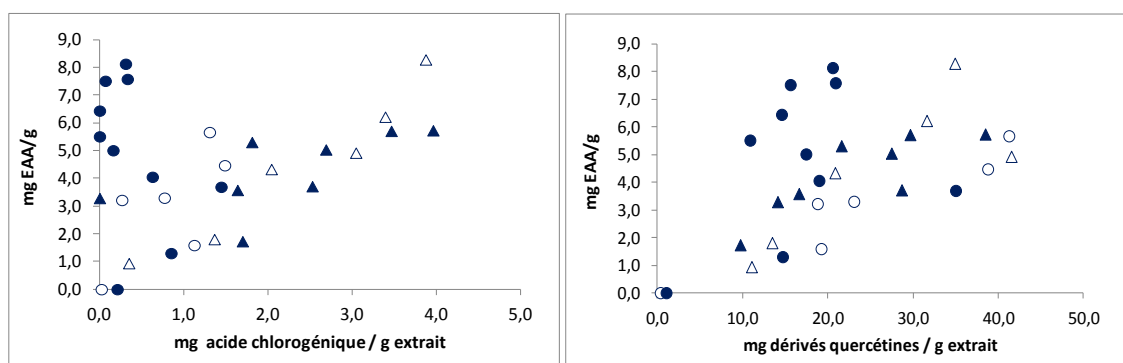
L'activité antioxydante des fractions d'épidermes blanchis (Figure 112) s'explique en partie par la présence de polyphénols (Figure 113) respectivement avec  $r^2 = 0,647$  et  $r^2 = 0,706$  pour EFS 28 et EFS 27 et notamment par les quantités d'acide chlorogénique pour EFS 27 ( $r^2 = 0,933$ ) (Figures 114). Les dérivés de quercétines ne sont globalement pas corrélés à la capacité antioxydante des fractions avec  $r^2 = 0,668$  et  $r^2 = 0,681$ , pour EFS 27 et EFS 28. Ainsi globalement, les extraits obtenus à partir d'épidermes blanchis présentent une moindre dispersion des points et par conséquent une meilleure corrélation que les fractions obtenues à partir d'épidermes bruts, avec toujours une meilleure corrélation des données obtenues en mode statique par rapport à ceux du mode dynamique.



**Figure 112 :** Capacité antioxydante exprimée en équivalent acide ascorbique (EAA, mg/g de matière sèche) des fractions produites par EFS en mode dynamique ou statique sur 30 g de pelures broyées traitées ou non thermiquement. ■ EFS 13/14 – statique, ■ EFS 27 - statique blanchi, ■ EFS 9/11 - dynamique 30 g, ■ EFS 28 - dynamique blanchi. (n=2, écart à la moyenne)



*Figure 113 : Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols (mg/g d'extrait sec) des fractions obtenues par EFS en dynamique ou en statique sur 30 g de pelures de pommes broyées blanchies ou non. ● EFS 9/11 - dynamique, ○ EFS 13/14 - statique, ▲ EFS 28 - dynamique blanchi, △ EFS 27 - statique blanchi.*



*Figure 114 : Tests de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur d'acide chlorogénique (mg/g) d'une part, et de dérivés de quercétine (mg/g) d'autre part. ● EFS 9/11 - dynamique, ○ EFS 13/14 - statique, ▲ EFS 28 - dynamique blanchi, △ EFS 27 - statique blanchi.*

### I.5. Influence de la température et de la composition du fluide

Il s'agit d'essayer d'améliorer la solubilité des polyphénols en jouant sur la température et la composition du fluide. La difficulté réside dans le fait que l'on souhaite un mélange monophasique, ce qui impose de s'appuyer sur les diagrammes ternaires CO<sub>2</sub>-éthanol-eau que nous détaillons ci-après. L'influence de la température (28 °C vs 50 °C) est analysée pour les modes statique et dynamique, avec une composition du fluide de 74 % molaire de CO<sub>2</sub> et 25 % de cosolvant éthanol à 96 %.



### **I.5.1. Diagrammes de phases des mélanges CO<sub>2</sub>+éthanol+eau**

Les diagrammes ternaires ont été calculés par Serge Laugier, enseignant-chercheur à l'I2M-TREFLE (UMR 5295, IPB, Université de Bordeaux) au moyen du logiciel Propy. Il n'existe pas de données de la littérature pour les pressions et températures qui nous intéressent (28 et 50 °C, 25 MPa). Les ternaires sont donc extrapolés à partir de données expérimentales se rapprochant le plus de nos conditions.

#### **a/ Température 50 °C, Pression 25 MPa**

Sur la Figure 115-1, sont portées les valeurs expérimentales ainsi que celles issues du modèle à 17 MPa, sont aussi portés les points de l'étude à 25 MPa, 2, 1 et 3, correspondant respectivement aux compositions CO<sub>2</sub>:EtOH:H<sub>2</sub>O de 72:19:9, 75:22:3 et 50:44:6.

L'augmentation de pression se traduit généralement par une amélioration de la miscibilité des constituants. Par conséquent, l'augmentation de pression de 17 à 25 MPa doit conduire à une réduction de la zone diphasique située au-dessous de la courbe verte. Il apparaît donc que les points 2 et 3 sont situés en zone monophasique. Le point 1 sera soit en zone monophasique, soit sur la courbe d'équilibre de phase et donc encore monophasique. A noter que ce point est de plus proche du point critique du mélange pour cette température et cette pression.

#### **b/ Température 28 °C, Pression 25 MPa**

Les points expérimentaux les plus proches sont à 35 °C et 50 °C et 17 MPa. Les calculs seront moins précis car ils demandent une double extrapolation en température et en pression. Aussi pour le modèle, la courbe de transition de phase et une courbe déplacée de +15 % ont été tracées sur la Figure 115-2.

Dans tous les cas, les 3 points de l'étude (4, 5 et 6) sont assez éloignés de cette courbe pour pouvoir affirmer qu'ils sont en zone monophasique. Ces points 4, 5 et 6 correspondent respectivement aux mélanges 74:23:3, 49:45:6 et 34:58:8.

Ainsi, tous les mélanges extractant explorés sont des mélanges monophasiques totalement miscibles.

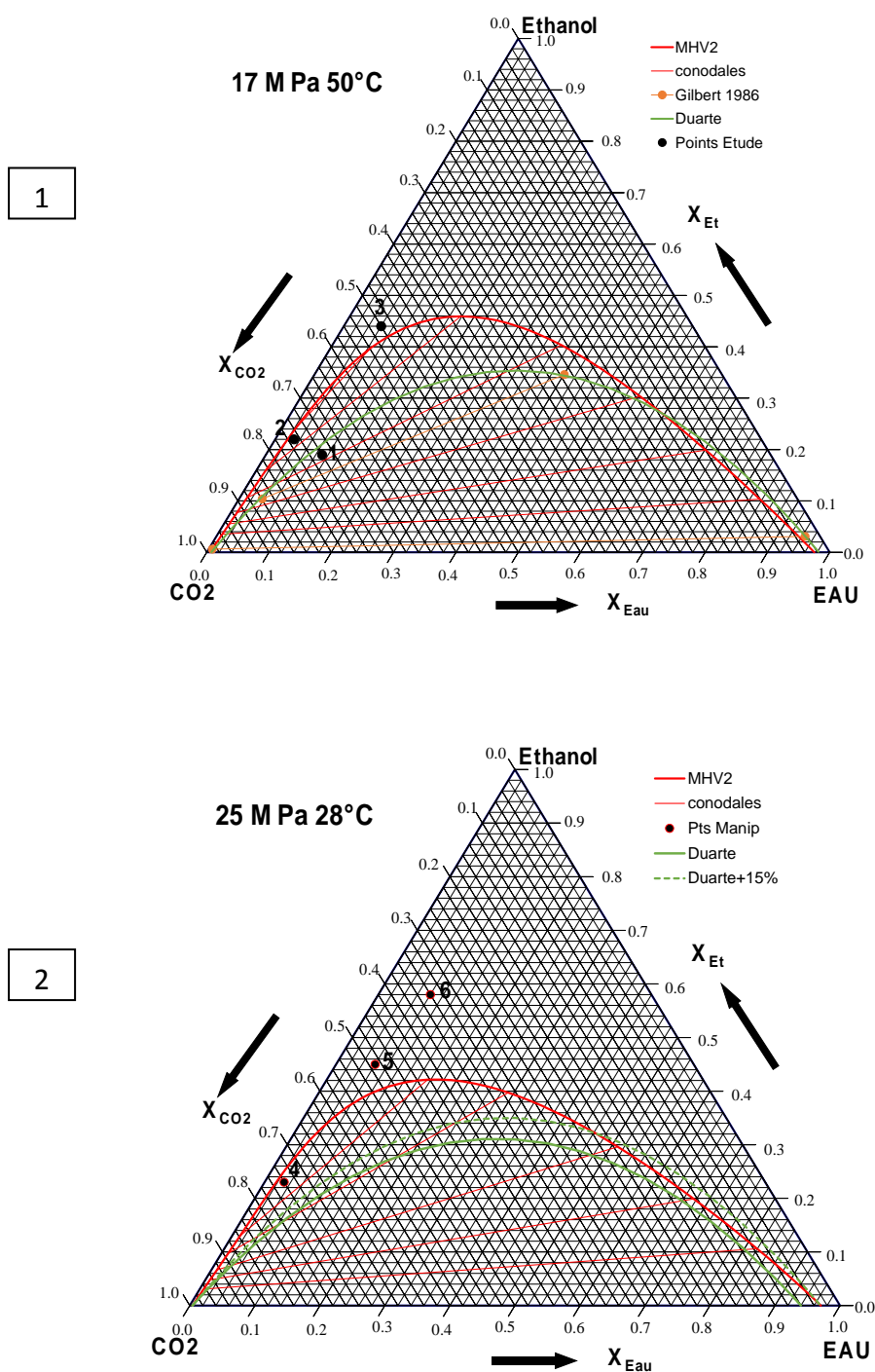


Figure 115 : Diagrammes de phases  $\text{CO}_2 + \text{EtOH} + \text{H}_2\text{O}$  : 1) 50 °C à 25 MPa, 2) 28 °C à 25 MPa.

### I.5.2. Effet de la température à composition constante de fluide extractant

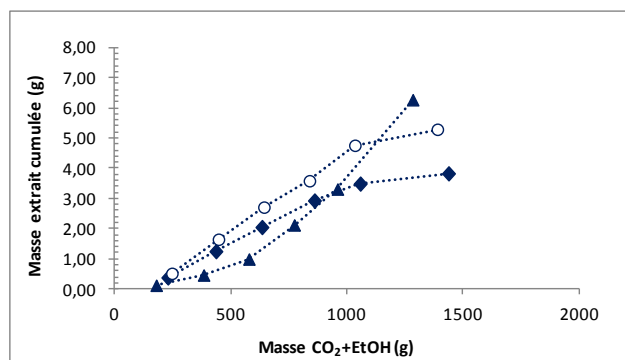
*Tableau 29 :* Effet de la température d'extraction ; P = 25 MPa, pelures broyées,  $F_{CO_2} = 7,4 \pm 0,4$  g/min,  $F_{solvant} = 3$  ml/min.

%mol : pourcentage molaire

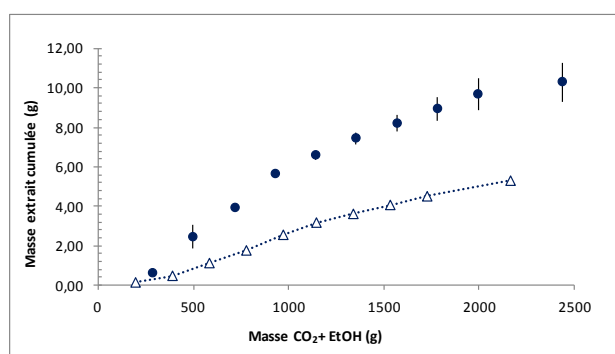
EFS	Charge	T°	Mode	Composition %mol (CO <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O)	N° ternaire	Nombre de fractions	M <sub>totale</sub> extraite	M <sub>fluide</sub>	Lot pommes
<b>EFS 13/14</b>	29,5 ± 0,5 g	50°C	statique	74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1	2	F0 à F5	5,27 ± 0,15 g	1386 ± 137 g	1
<b>EFS 10</b>	23 g	28°C	statique	73,8 : 23,1 : 3,1	4	F0 à F5	6,3 g	1280 g	1
<b>EFS 9/11</b>	28,5 ± 1,5 g	50°C	dynamique	76,4 ± 1 : 20,8 ± 0,8 : 2,8 ± 0,1	2	F0 à F9	10,3 ± 1 g	2436 ± 60 g	1
<b>EFS 20</b>	28,7 g	30°C	dynamique	75:22:03	4	F0 à F9	5,3 g	2164 g	2

Pour EFS 10, le lot et les conditions sont cohérents avec les autres extractions, mais la charge est significativement plus faible (23 g au lieu de 30 g), ce qui comme nous l'avons vu précédemment est plutôt bénéfique à l'extraction (Tableau 29). Néanmoins, la masse extraite globale ou pour chaque polyphénol a toujours été moindre à partir de 15 g de charge que de 30 g. Pour tenir compte de cet effet de charge, nous avons rappelé sur la Figure 116 la cinétique obtenue avec une charge de 15 g. La courbe à 28 °C se trouve en deçà des courbes à 50 °C jusqu'à 1 kg de fluide extractant, ce qui traduit une moins bonne extraction au moins pour les premières 80 minutes d'extraction. Au delà, et c'est visible sur le dernier point, la masse extraite serait plus importante. Une température faible semble donc ralentir l'extraction, ce qui est compatible avec l'effet de la température sur les processus de transfert de matière. Par ailleurs, concernant l'apparence de la matrice après traitement FSC, l'échantillon traité à 28 °C (EFS 10) comme celui traité à 30 °C (EFS 20) ont un aspect plus spongieux que les autres résidus qui se présentent généralement sous forme d'une matière friable et sèche (environ 2 % d'eau). Cela traduit bien la difficulté à éliminer les solvants résiduels d'une extraction conduite à "froid".

En mode dynamique, EFS 20 est directement comparable à EFS 9/11 en termes de charge traitée, mais la masse totale de fluide est de 10 % plus faible en raison d'un débit de CO<sub>2</sub> légèrement plus faible. La principale difficulté dans l'interprétation viendra du lot différent. L'effet de la température pour le protocole dynamique est illustré sur la Figure 117. Le ralentissement est notable. Néanmoins, cette cinétique est établie à partir de pommes issues d'un lot différent. Nous pouvons admettre que le lot ait une incidence sur les composés minoritaires tels que les polyphénols au regard des résultats de la littérature, mais pour ce qui relève de composés majoritaires tels que les carbohydrates et les protéines par exemple, la teneur devrait moins varier d'un lot à l'autre. Il est alors raisonnable de supposer que le ralentissement de la cinétique est dû à la plus faible température.



*Figure 116: Effet de la température sur la masse extraite totale en statique. ○ EFS 13/14 – 30 g à 50 °C, ▲ EFS 10 – 23 g à 28 °C, ◆ EFS 15 – 15 g à 50 °C (même lot de pommes). (n=2, écart à la moyenne)*



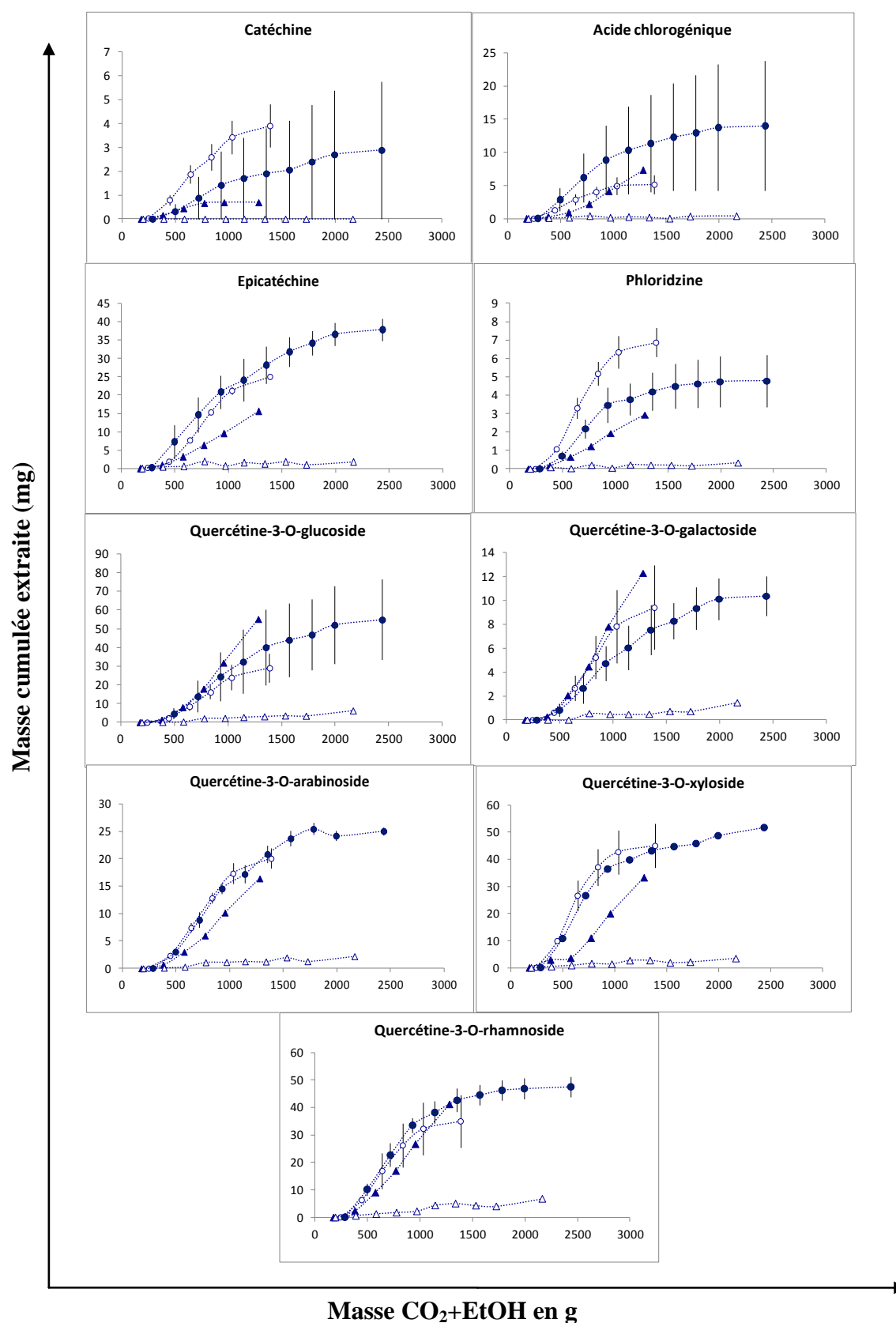
*Figure 117: Effet de la température sur la masse extraite totale en dynamique. ● EFS 9/11 – 28 g à 50 °C, △ EFS 20 – 28 g à 30 °C (2 lots différents). (n=2, écart à la moyenne)*

Les données d'extraction des polyphénols sont rassemblées Figures 118 et dans le Tableau 30. Pour les essais réalisés en mode statique et sur un même lot de pommes (EFS 10 vs EFS 13/14), la diminution de température retarde l'extraction de tous les polyphénols, c'est-à-dire qu'il faut attendre la 3<sup>ème</sup> fraction pour commencer l'extraction des polyphénols. Cet effet peut être imputable aux effets généraux de température sur les propriétés de transport, à savoir une diminution des coefficients de diffusion et une augmentation de la viscosité et de la densité des solvants quand la température diminue et/ou à l'effet de la température sur la solubilité qui ici, diminuerait quand la température diminue. Les valeurs normalisées sont analysées Figure 119 et mettent en évidence que la température a peu d'effet puisque les courbes sont très proches, ce qui pourrait indiquer que la température influe plus sur la solubilité que sur les transferts de masse. Pour les différents polyphénols et en restant sur l'analyse des données en mode statique, une température faible (28 °C, EFS 10) semble diminuer notablement l'extraction de la plupart des composés, sauf pour la quantité de quercétine-rhamnoside qui reste globalement inchangée et les dérivés -glucoside et -galactoside qui sont mieux extraits à 28 °C qu'à 50 °C d'autant que la masse de charge à 28 °C est de 23 g au lieu de 30 g. Lorsque les quantités extraites à 1,1 kg sont

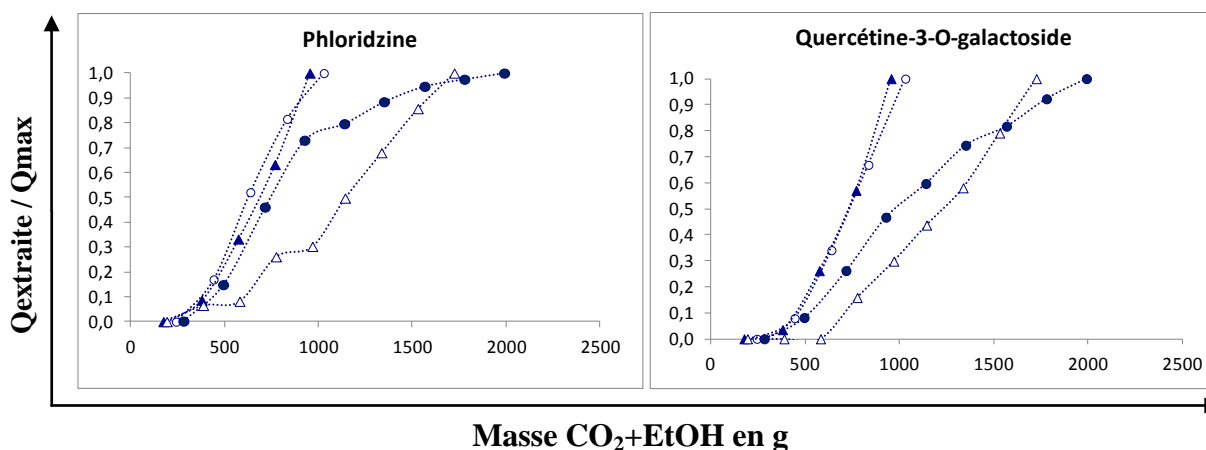
rapportées à 100 g de charge afin de niveler les écarts sur la charge (Tableau 30), nous constatons que 814 mg de polyphénols ont été extraits « à froid » contre 550 mg extraits à 50 °C. L'écart provient essentiellement d'une plus grande masse des dérivés quercétine. Donc, quand nous rapportons les résultats en charge équivalente, c'est l'extraction à 28 °C qui conduit à une meilleure extraction des polyphénols en améliorant particulièrement l'extraction des dérivés quercétine.

Pour la catéchine, c'est la très faible quantité extraite à 28 °C qui est surprenante. Le fait d'obtenir un plateau traduit qu'il n'y a plus de catéchine extraite. Soit elle n'est plus disponible (dégradée, polymérisée...), soit il n'y en avait très peu à l'origine dans la charge initiale. Les travaux d'Ananingsih *et al.* (2013) décrivent la catéchine comme un composé sensible à la température. Dès 40 °C, l'épimérisation de la catéchine serait responsable de sa dégradation en épigallocatechine gallate, en gallocatechine et d'autres dérivés.

Dans le cas de l'extraction en mode dynamique, réalisée à 30 °C sur un lot globalement moins riches en polyphénols, l'effet devrait être discuté au cas par cas. Néanmoins, si nous regardons par exemple le dérivé de quercétine-glucoside qui est 2 fois moins abondant dans le lot n°2 que dans le lot n°1, son extraction à 30 °C (EFS 20) est bien en deçà et de plus d'un facteur 2 de celle de son extraction à 50 °C. De même si les cinétiques normalisées sont analysées (Figure 119), nous avons une plus faible ou au mieux équivalente, extraction de tous les polyphénols à 30 °C qu'à 50 °C. La tendance, en mode dynamique, respecte globalement ce qui est observé dans la littérature, alors que le mode statique met en évidence un comportement singulier, avec davantage de dérivés quercétine extraits à froid.



*Figure 118 : Quantités cumulées (en mg) des polyphénols obtenus par EFS à 28 °C ou 50 °C avec différentes composition de fluides, sur 30 g de pelures de pommes broyées, en fonction de la masse de fluide. ○ EFS 13/14 - statique à 50 °C, ▲ EFS 10 - statique à 28 °C, ● EFS 9/11 - dynamique à 50 °C, △ EFS 20 - dynamique à 30 °C. EFS 20 est réalisée avec des pommes du lot n°2. (n=2, écart à la moyenne)*



**Figure 119 :** Cinétique normalisée d'extraction des polyphénols obtenus par EFS à 28 °C ou 50 °C sur 30 g de pelures de pommes broyées, en fonction de la masse de fluide. ○ EFS 13/14 - statique à 50 °C, ▲ EFS 10 - statique à 28 °C, ● EFS 9/11 - dynamique à 50 °C, △ EFS 20 - dynamique à 30 °C. Les autres cinétiques normalisées sont présentées en annexe Figure 154.

**Tableau 30 :** Rendement des composés phénoliques extraits pour chacune des conditions : statique 50 °C - EFS 13/14, statique 28 °C – EFS 10, dynamique 50 °C – EFS 9/11, dynamique 30 °C - EFS 20, sur des épidermes de pommes Golden (25 MPa). (n=2, écart à la moyenne)

Méthode	EFS 13/14 - statique 50°C	EFS 10 - statique 28°C	EFS 9/11 - dynamique 50°C	EFS 20 - dynamique 30°C
Solvant (mol)	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 75:22:03	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 74:23:03	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 75:22:03	CO <sub>2</sub> :EtOH:H <sub>2</sub> O 75:22:03
Ratio solvant/pelures <sup>a</sup>	37	48	37	38
T / P	50°C / 25 MPa	28°C / 25 MPa	50°C / 25 MPa	30°C / 25 MPa
Rendement global <sup>a</sup> (g/100g pelures sèches <sup>d</sup> )	15,8 ± 0,2	27,2	22,0 ± 0,7	18,5
Quantité de polyphénols <sup>a</sup> (mg/100g de pelures sèches <sup>d</sup> )				
Polyphénols totaux	550 ± 115	814	603 ± 182	199
Catéchine	11,4 ± 2,3	3	6,0 ± 6,0	0
Acide chlorogénique	16,4 ± 4,5	31,9	36,2 ± 23,0	3,2
Epicatéchine	71,6 ± 3,4	67,8	78,7 ± 11,4	17,6
Phloridzine	21,5 ± 3,0	12,8	13,2 ± 3,0	6,8
Quercétine-3-glucoside	81,2 ± 23,0	240,2	113,7 ± 60,4	33,1
Quercétine-3-galactoside	26,5 ± 10,4	53,5	21,2 ± 5,7	9,4
Quercétine-3-arabinoside	67,6 ± 8,3	81,5	54,6 ± 5,7	23,7
Quercétine-3-xyloside <sup>b</sup>	144,5 ± 27,5	144,5	139,8 ± 14,2	50,9
Quercétine-3-rhamnoside <sup>b</sup>	109,3 ± 32,8	179	134,2 ± 46,4	54,8
Concentration en polyphénols totaux (g polyphénols/kg extrait)	34,7	18,2	27,4	1,1

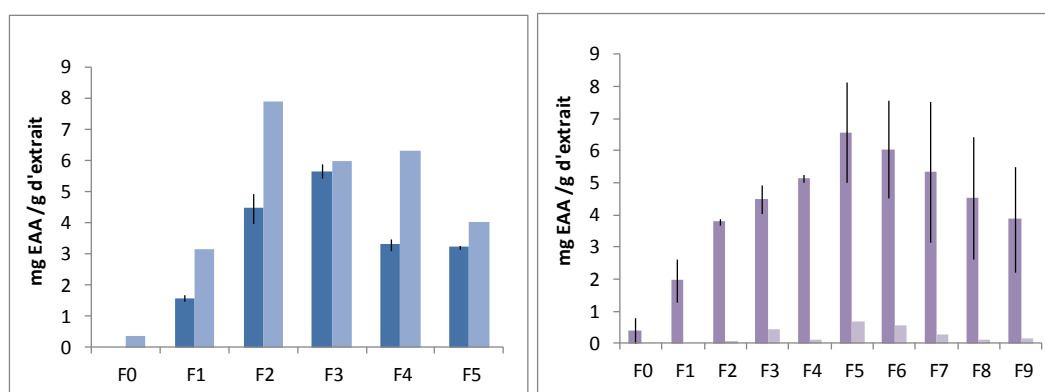
<sup>a</sup> pour 1,1 kg de fluide extractant EFS

<sup>b</sup> exprimé en équivalent quercétine-3-arabinoside

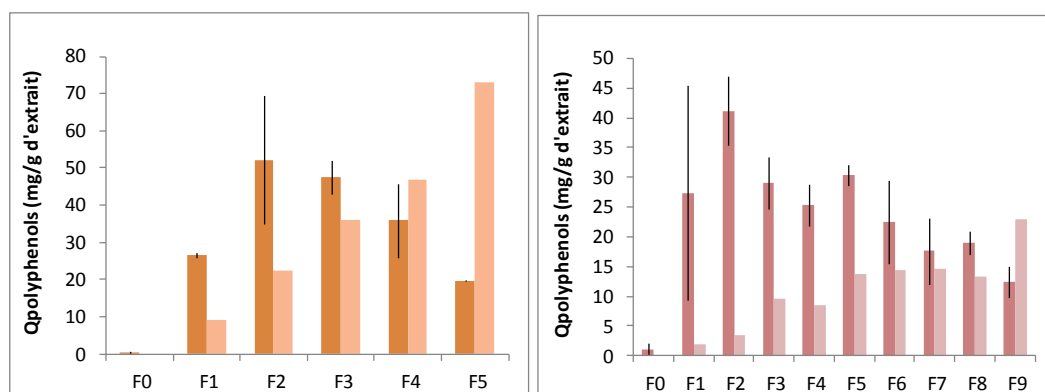
<sup>c</sup> données correspondant à une moyenne entre les résultats statique et dynamique quand ils sont similaires

<sup>d</sup> pelures sèches = pelures lyophilisées contenant 5-7% d'humidité

Si l'intérêt se porte sur les activités antioxydantes des fractions obtenues en EFS, (Figure 120), la faible extraction des polyphénols dans l'essai réalisé à 28 °C amène une faible activité antioxydante des fractions. En revanche, il est nettement mis en évidence que les activités antioxydantes des EFS à 28 °C ne sont absolument pas corrélées avec les quantités de polyphénols totaux présents dans les fractions (Figure 121). Les composés des dernières fractions obtenues à 28 °C sembleraient avoir une capacité antioxydante plus forte que les autres fractions. La minorité de polyphénols extraits vers 1,1 kg et 1,5 kg de fluide sont responsables de cette activité ou d'autres molécules non phénoliques extraites tardivement en sont responsables.



**Figure 120:** Capacité antioxydante exprimée en mg EAA/g d'extrait pour chacune des fractions extraites en EFS. ■ EFS 13/14 - statique 50 °C, ■ EFS 10 - statique 28 °C, ■ EFS 9/11 - dynamique 50 °C, ■ EFS 20 - dynamique 30 °C. (n=2, écart à la moyenne)

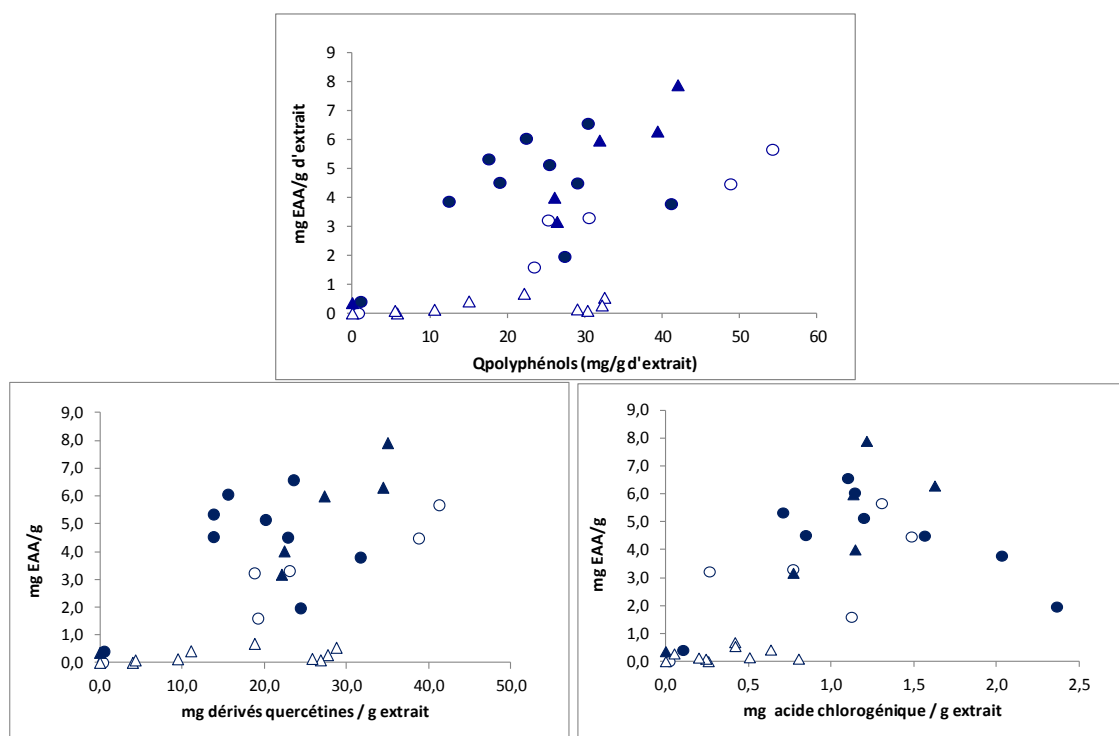


**Figure 121:** Quantité de polyphénols totaux exprimée en mg EAA/g d'extrait pour chacune des fractions extraites en EFS. ■ EFS 13/14 - statique 50 °C, ■ EFS 10 - statique 28 °C, ■ EFS 9/11 - dynamique 50 °C, ■ EFS 20 - dynamique 30 °C. (n=2, écart à la moyenne)

Les tests de corrélation entre la capacité antioxydante et la quantité de polyphénols, d'acide chlorogénique ou de dérivés de quercétine (Figure 122) montrent que l'activité de EFS 10 est bien corrélée à sa composition en polyphénols totaux et en dérivés quercétines avec respectivement des



$r^2 = 0,915$  et  $r^2 = 0,908$  et dans une moindre mesure avec la quantité d'acide chlorogénique ( $r^2 = 0,753$ ). Comme déjà observé précédemment, les données "dynamique" sont plus dispersées, donc moins bien corrélées que celles issues du protocole statique.



**Figure 122 :** Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux, acide chlorogénique et dérivés quercétines (en mg). ○ EFS 13/14 - statique à 50 °C, ▲ EFS 10 - statique à 28 °C, ● EFS 9/11 - dynamique à 50 °C, △ EFS 20 - dynamique à 30 °C.

### I.5.3. Effet de la composition du fluide extractant à 50 °C et 28 °C

La polarité du solvant a été modifiée en mode statique à 28 °C et à 50 °C (Tableau 31). A 50 °C, EFS 13/14 (75:22:3) vs EFS 17 (72:19:9) et EFS 18 (50:44:6) ont été comparés. Il faut faire attention à l'interprétation de EFS 18 car les extraits n'ont pas été évaporés entièrement à sec donc il reste de l'eau dans les fractions. En revanche, il n'y a aucun problème de lot entre EFS 13/14, EFS 17 et EFS 18. A 28 °C, les extractions EFS 10 (74:23:3) vs EFS 22 (49:45:6) et EFS 24 (34:58:8) seront comparées entre elles malgré deux lots différents.

D'un point de vue macroscopique, le résidu de l'essai EFS 24 est imbibé d'éthanol, ce qui indique que l'élimination (et/ou la désorption) du cosolvant par 1 heure de flux de CO<sub>2</sub> a été incomplète. Il aurait fallu pousser plus longtemps en CO<sub>2</sub> pur pour éliminer le cosolvant des mélanges plus riches en EtOH/eau. Les compositions de fluide des EFS 13/14, EFS 17, EFS 10 et EFS 22 ont permis d'obtenir des matières sèches et friables ce qui signifie que le flux terminal de CO<sub>2</sub> pur permet bien d'éliminer les cosolvants de la matrice.

Le détail des conditions est précisé Tableau 31. La variation de composition a été réalisée dans la pratique en maintenant le débit total au même ordre de grandeur, c'est à dire que les deux débits de CO<sub>2</sub> et de cosolvant ont été modifiés simultanément et en utilisant plus uniquement de l'éthanol à 96 % mais un pré-mélange éthanol absolu /eau (EFS 17 et EFS 24).

*Tableau 31 : Paramètres EFS dans l'effet de la température d'extraction; P = 25 MPa, 30 g de pelures broyées, protocole statique.  
% mol : pourcentage molaire*

EFS	Charge	T°	F <sub>CO2</sub> g/min	F <sub>cosolvant</sub> ml/min	F <sub>tot</sub> g/min	Composition %mol (CO <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O)	Ratio EtOH/H <sub>2</sub> O	N° ternaire	Nombre de fractions	M <sub>totale</sub> extraite	M <sub>fluide</sub>	Lot pommes
<b>EFS 13/14</b>	29,5 ± 0,5 g	50°C	6,6	3	9	74,4 ± 1,4 : 22,5 ± 1,2 : 3 ± 0,1	7,6	2	F0 à F5	5,27 ± 0,15 g	1386 ± 137 g	1
<b>EFS 17</b>	30 g	50°C	7,6	3	10	72,4 : 18,7 : 8,8	2,1	1	F0 à F5	3,8 g	1627 g	1
<b>EFS 18</b>	30 g	50°C	5	6	9,8	50,4 : 43,5 : 6,1	7,1	3	F0 à F5	> 21* g	1419 g	1
<b>EFS 10</b>	23 g	28°C	6,9	3	9,3	73,8 : 23,1 : 3,1	7,4	4	F0 à F5	6,3 g	1280g	1
<b>EFS 22</b>	30,5 g	30°C	5	6,3	9,8	49,2 : 44,6 : 6,2	7,2	5	F0 à F5	10,7 g	1250 g	2
<b>EFS 24</b>	29,7 g	27°C	3	7	8,6	34,4 : 57,8 : 7,8	7,4	6	F0 à F4	8,1g	836 g	2

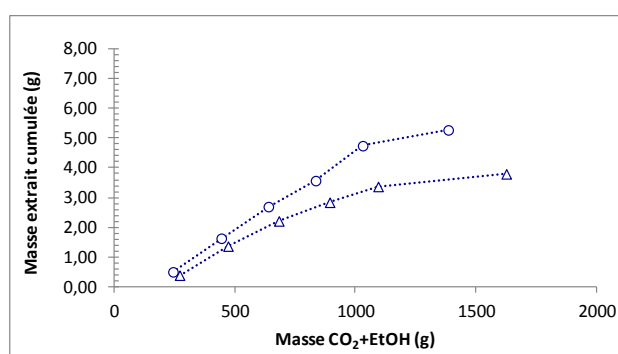
\*: la présence d'eau dans les fractions nuit à la quantification de la masse totale extraite car les fractions n'ont pu être amenées à sec par évaporation sous flux d'azote. Le volume d'eau présent est bien inférieure à 1 ml/ fraction, donc pour l'interprétation des résultats, il faut retirer au maximum 1 g/fraction représentant les 1 ml d'eau/fraction. La masse globale extraite étant d'environ 21 g avec 6 fractions au total : 1 g\*6 = 6 g d'où 22-6= 16 g.

Les cinétiques d'extraction de la masse totale à 50 °C et 27-30 °C sont données respectivement dans les Figures 123 et 124. Pour les extractions à 27-30 °C réalisées sur un même lot et en faisant abstraction du dernier point de EFS 24, plus le mélange extractant est riche en cosolvant, plus grande est la masse extraite. Les résultats de EFS 10 sont cohérents avec les précédents, puisque les masses extraites, même recalculées pour 30 g de charge (Figure 124), sont inférieures aux précédentes (à l'incertitude près de la variabilité due au lot). Dans cette série, c'est la proportion entre le CO<sub>2</sub> et le cosolvant qui a changé, alors que la composition même du cosolvant est restée globalement fixe (ratio entre éthanol et eau de 7,2 – 7,4). Dans le diagramme ternaire des phases, cela s'est traduit par une évolution notable du point figuratif (du point 4 aux points 5 puis 6) en direction de la "pointe" éthanol du triangle. L'augmentation de la proportion en cosolvant induit une augmentation de la polarité. Nous supposons que cette augmentation de polarité améliore la solubilisation de plus de molécules de plus en plus hydrophiles qui contribuent alors à augmentation de la quantité extraite.

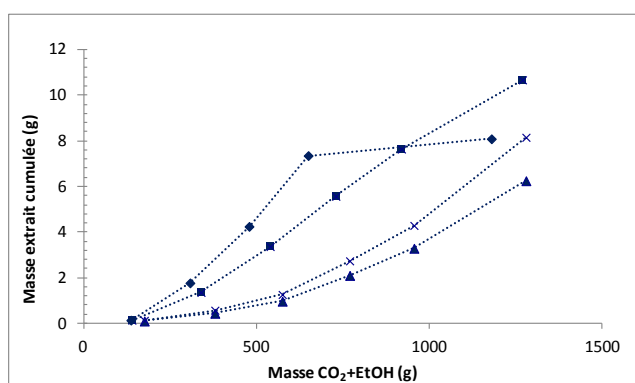
A 50 °C, la variation de composition se situe à deux niveaux. Entre EFS 13/14 et EFS 18 (point 2 à 3 dans le diagramme ternaire), nous sommes comme précédemment dans une augmentation de la teneur en cosolvant polaire dans le fluide extractant. Malheureusement, la non élimination de traces d'eau dans les fractions soumises à évaporation pour évaluer la masse extraite n'a pas

permis de faire un bilan précis. La deuxième variation (EFS 13/14 à EFS 17, point 2 à 1 dans le ternaire) consiste essentiellement en une variation du ratio éthanol/eau de 7,6 à 2. En termes d'extraction, cette augmentation de la teneur en eau dans le mélange extractant pénalise légèrement les quantités globales extraites. Autrement dit, quand la part de l'eau est diminuée (tout en augmentant celle de  $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$ ), plus de matière est extraite. Parmi les molécules extraites, une partie est donc constituée par des molécules peu hydrophiles.

Pour les essais réalisés à 29 °C, les résultats montrent qu'une augmentation importante de la polarité via la réduction significative de la teneur en  $\text{CO}_2$  dans le fluide extractant se traduit par une augmentation de la quantité globale extraite.



**Figure 123 :** Effet de la composition du fluide extractant sur la masse extraite à 50 °C ;  $P = 25 \text{ MPa}$ , 30 g de pelures broyées, protocole statique. ○ EFS 13/14 – 74:23:3 % molaire, △ EFS 17 – 72:19:9 % molaire.



**Figure 124 :** Effet de la composition du fluide extractant sur la masse extraite à 29 °C ;  $P = 25 \text{ MPa}$ , 30 g de pelures broyées, protocole statique. ▲ EFS 10 – 74:23:3 %mol 23 g, ■ EFS 22 – 49:45:6 % molaire, ◆ EFS 24 – 34:58:8 % molaire, × EFS 10 – 74:23:3 % molaire rapporté à 30 g de charge.

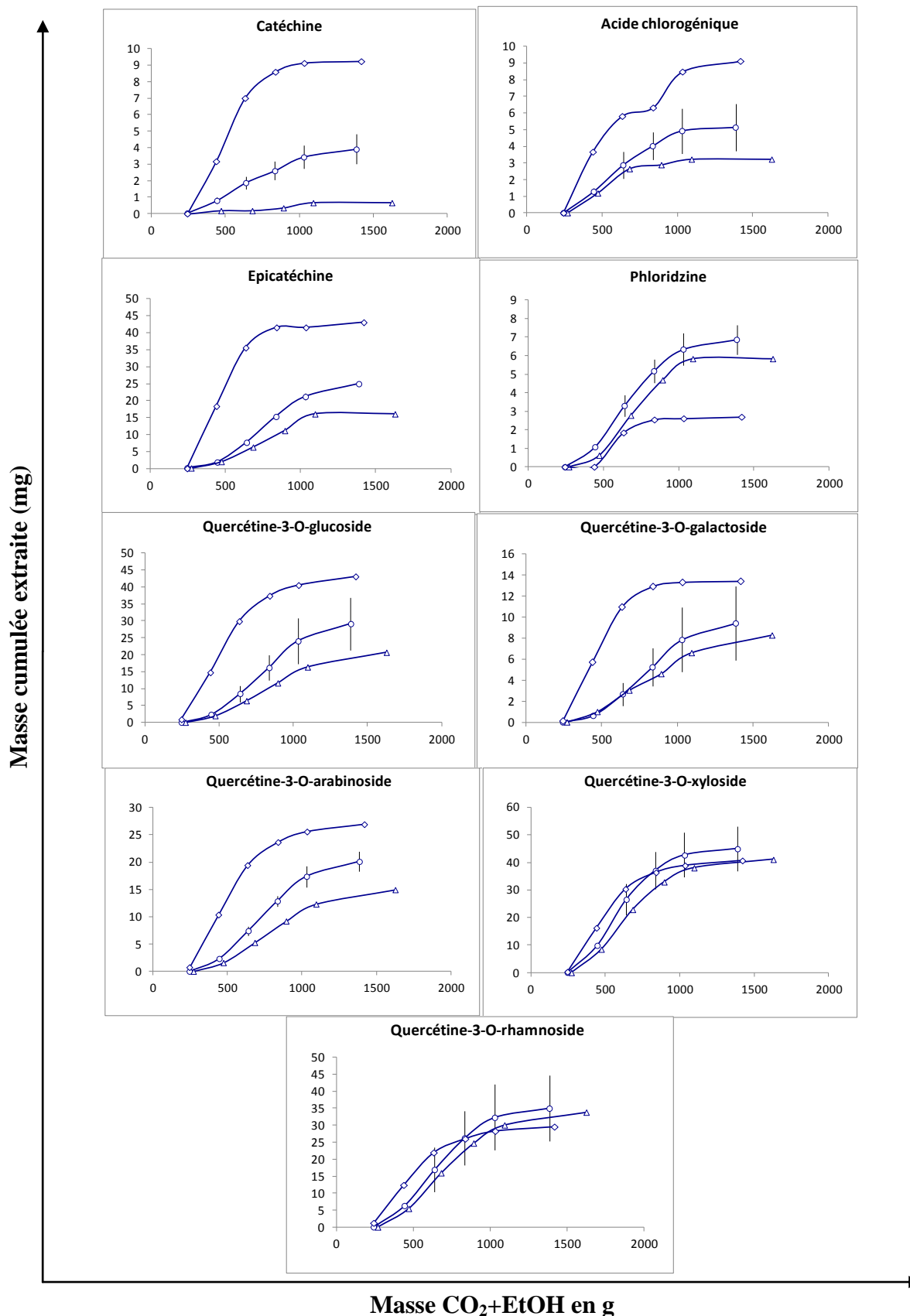


Figure 125 : Courbes d'extraction des polyphénols à différentes compositions de fluide extractant ( $\text{CO}_2$  : EtOH : Eau, ratio en mol), à  $T^\circ = 50^\circ \text{C}$  et 30 g de charge.  $\circ$  EFS 13/14 (74:23:3),  $\triangle$  EFS 17 (72:19:9),  $\diamond$  EFS 18 (50.4:43.5:6.1). ( $n=2$ , écart à la moyenne)

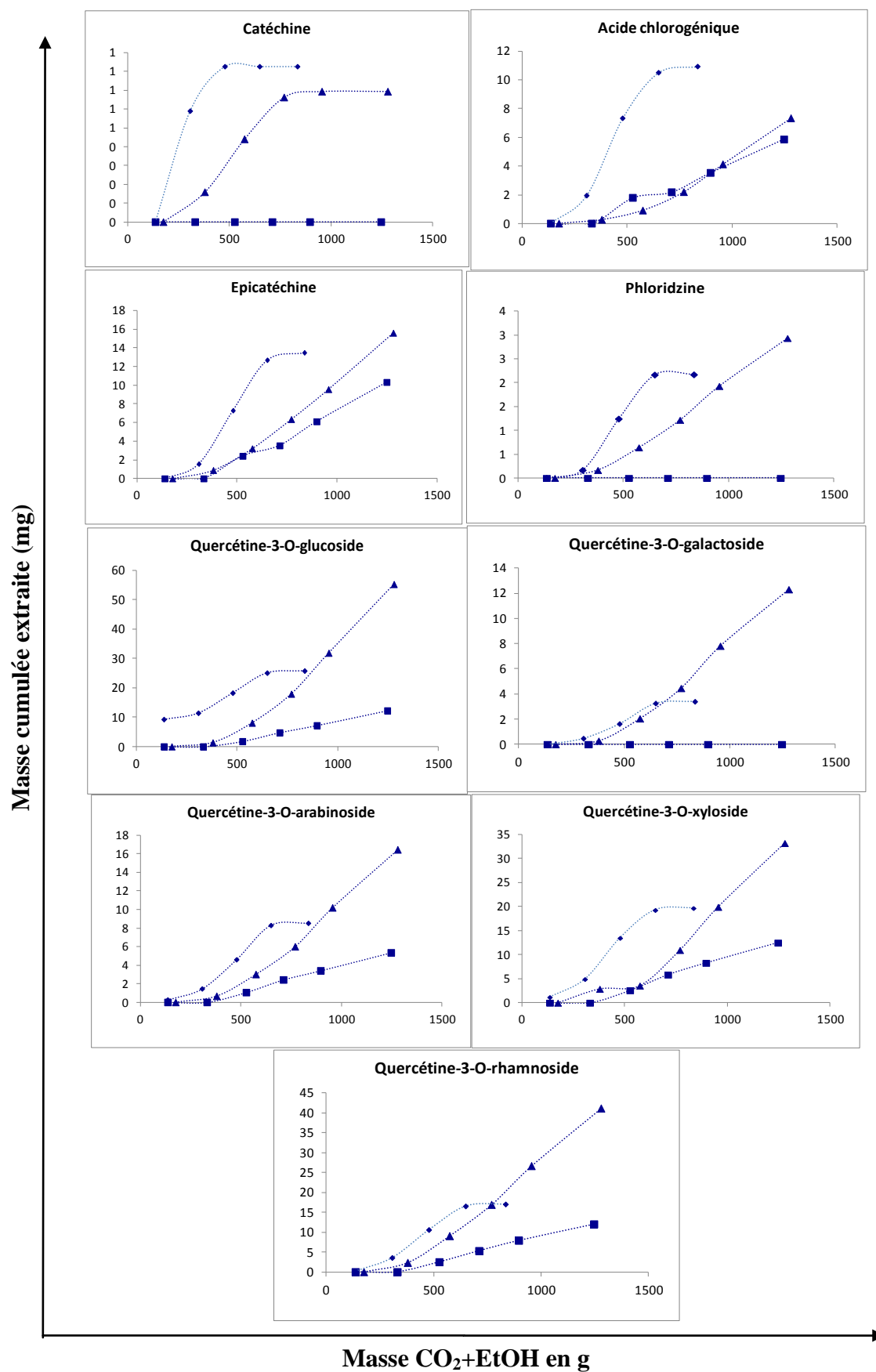


Figure 126 : Courbes d'extraction des polyphénols à différentes compositions du fluide extractant, à  $T = 28^{\circ}\text{C}$ .  $\blacktriangle$  EFS 10 – 74:23:3 - 23 g,  $\blacksquare$  EFS 22 – 49:45:6 – 30 g,  $\blacklozenge$  EFS 24 – 34:58:8-30 g.

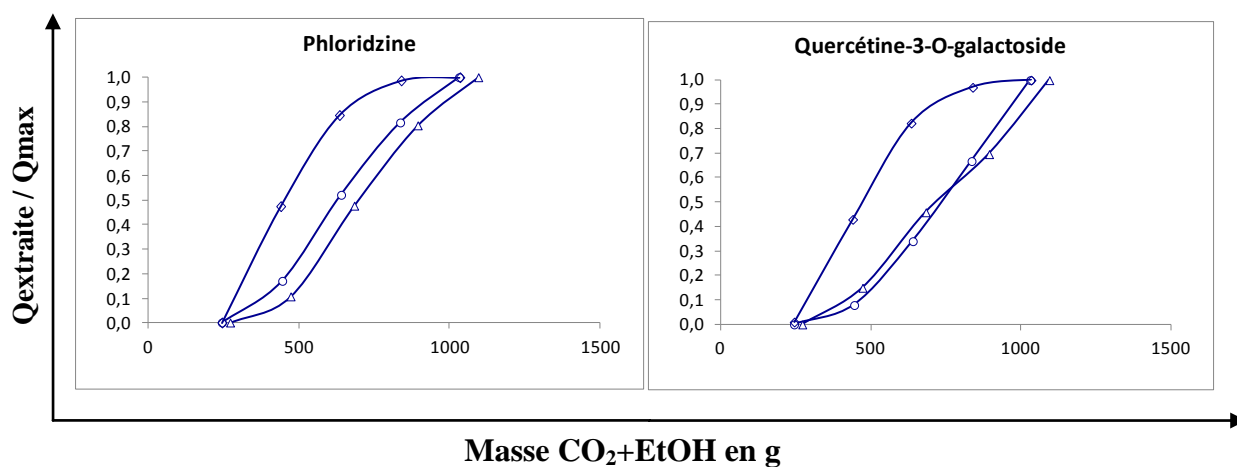


Figure 127 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols à différentes compositions de fluide extractant ( $\text{CO}_2$  : EtOH : Eau, ratio en mol), à  $T = 50^{\circ}\text{C}$  et 30 g de charge.  $\circ$  EFS 13/14 (74:23:3),  $\Delta$  EFS 17 (72:19:9),  $\diamond$  EFS 18 (50.4:43.5:6.1) Les autres figures sont présentée en annexe Figure 155.

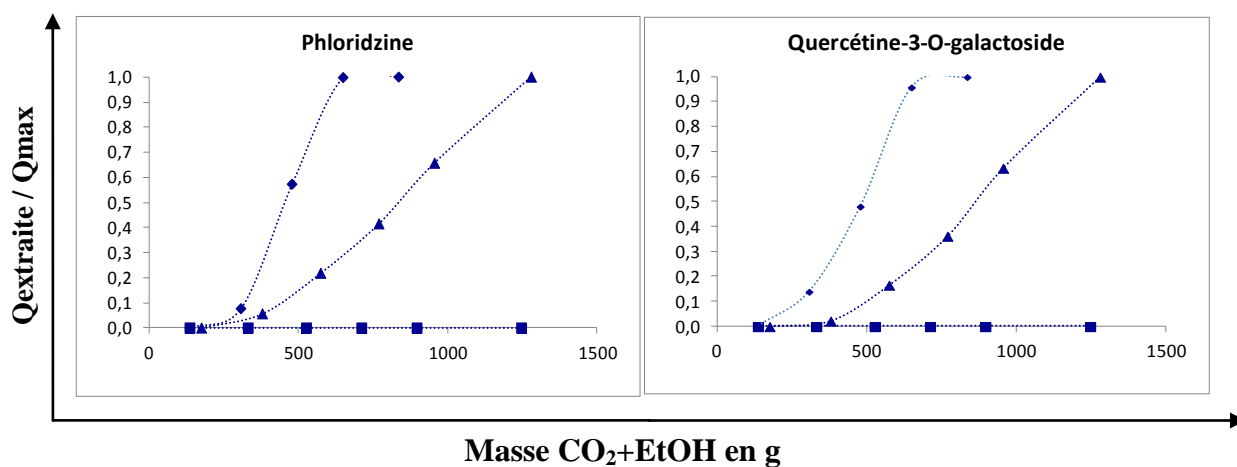


Figure 128 : Cinétique normalisées d'extraction des polyphénols à différentes compositions du fluide extractant,  $T = 28^{\circ}\text{C}$ .  $\blacktriangle$  EFS 10 – 74:23:3- 23 g,  $\blacksquare$  EFS 22 – 49:45:6- 30 g,  $\blacklozenge$  EFS 24 – 34:58:8-30 g. Les autres courbes d'extractions normalisées de polyphénols sont présentées en annexe Figure 156.

Pour ce qui relève des polyphénols, les courbes d'extraction sont données respectivement en Figures 125 et 126, à 50 °C et à 29 °C. Les représentations en cinétiques normalisées sont présentées en Figures 127 et 128 aux températures de 50 °C et 29 °C. Le complément des courbes se trouve en annexe Figures 155 et 156.

A 50 °C, pour la majorité des polyphénols, une augmentation significative du pourcentage de cosolvant dans le fluide extractant (de 25 % dans EFS 13/14 à 50 % dans EFS 18) se traduit par une augmentation de la quantité extraite par unité de masse de fluide avec pour certains polyphénols, l'apparition d'un début de plateau à 1 kg de fluide passé (Figure 125). L'augmentation se traduit par un facteur 2 voire 3 pour le groupe des quercétines –glucoside et -galactoside, de l'épicatéchine, l'acide chlorogénique, d'une part et la catéchine d'autre part, mais elle peut être quasi nulle comme pour les dérivées quercétine-xyloside et -rhamnoside. Pour ce qui relève de l'amélioration du taux d'extraction avec la teneur en cosolvant, les résultats sont cohérents avec ceux de la littérature, généralement évalués en termes de quantité de polyphénols totaux extraits (Murga 2000, Hasbey Adil 2007, Serra 2010b). L'augmentation de la quantité extraite est probablement due à une plus grande solubilité comme l'ont montré Murga *et al.* (2000) pour la catéchine et l'épicatéchine ou Chafer *et al.* (2004), pour la quercétine. La phloridzine a un comportement singulier avec une quantité extraite plus faible pour un taux de cosolvant élevé et un plateau bien établi dès 0,8 kg de fluide (Figure 125). Ce composé est-il sensible à une trop riche proportion d'éthanol/eau, c'est-à-dire, subit-il une dégradation/réaction, une précipitation ou une polymérisation dans ces conditions ?

Les courbes obtenues pour une teneur plus riche en eau (EFS 17 vs EFS 13/14) sont cohérentes avec l'évolution observée sur la masse totale extraite, avec une quantité extraite globalement du même ordre de grandeur ou légèrement inférieure pour la plupart des polyphénols (toujours sur la base des fractions collectées avant le "rinçage" en CO<sub>2</sub> pur, c'est à dire sans tenir compte du dernier point sur les courbes). Les polyphénols peu ou pas sensibles à ce ratio éthanol/eau sont les dérivés quercétine -rhamnoside, -xyloside, -galactoside, la phloridzine et l'acide chlorogénique. Les polyphénols sensibles à ce ratio sont la catéchine et dans une moindre mesure l'épicatéchine et la quercétine-arabinoside. A partir du moment où tous les composés ne réagissent pas de la même façon à la variation de ce paramètre, nous pouvons admettre que ce ne sont pas les processus de transferts de matière qui sont impactés mais bien la solubilisation et/ou des éventuelles mécanismes de redistribution ou de dégradation au sein de la matrice ou du fluide. Pinelo *et al.* (2007) ont par ailleurs rapporté que la catéchine, l'épicatéchine et la quercétine ont une forte tendance à se polymériser.

Il est difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature car il n'y a pas de travaux publiés sur le comportement de ces polyphénols de pommes en milieu CO<sub>2</sub>-cosolvant. Néanmoins, Rupasinghe *et al.* (2011), analysant l'influence de solvants sur l'extraction spécifique

des dérivés de quercétine de la pomme (extraction par solvant pur, donc sans CO<sub>2</sub>), ont montré que l'eau n'extrait pas ces composés, à la différence du méthanol (l'éthanol n'a pas été testé). Il en va de même pour l'extraction globale et l'extraction des polyphénols à partir de marcs de raisin qui sont plus élevées avec l'éthanol qu'avec de l'eau (Pinelo 2007). Les polyphénols de pommes sont davantage extraits par un mélange éthanol: eau 10:90 que par 100 % d'eau (Pinelo 2008). Si nous nous appuyons maintenant sur les résultats obtenus en milieu CO<sub>2</sub> sur d'autres composés phénoliques, les tendances sont généralement à l'inverse de ce que nous observons, à savoir plutôt une augmentation de la masse extraite avec une augmentation de la teneur en eau. A noter que les variations en eau rapportées dans la littérature sont nettement plus importantes que celles effectuées ici. En effet, Seabra *et al.* (2010) ont comparé des extractions réalisées à deux compositions différentes de cosolvant, même si dans ce cas, le CO<sub>2</sub> n'est présent qu'à 10 %. Les mélanges sont EtOH:CO<sub>2</sub> (90/10) et EtOH/H<sub>2</sub>O:CO<sub>2</sub> (90 :10), avec un ratio EtOH/H<sub>2</sub>O de 8:2 (v:v). L'absence d'unités pour la composition globale ne permet pas de calculer la composition molaire du ternaire. Quoiqu'il en soit, les résultats montrent que la présence d'eau dans le mélange extractant permet de doubler la quantité extraite des polyphénols analysés (cyanidine-3-sambubioside, cyanidine-3-glucoside, anthocyanes totales et rutine). Sur des mélanges extractant plus riches en CO<sub>2</sub>, Da Porto *et al.* (2014) ont comparé l'extraction de proanthocyanidines avec des mélanges CO<sub>2</sub>+15 % éthanol ou CO<sub>2</sub>+15 % d'eau. L'extraction à l'eau comme cosolvant s'est révélée être plus efficace, avec une valeur de 633 mg GAE/100 g<sub>matière sèche</sub> en polyphénols totaux à comparer aux 268 mg GAE/100 g<sub>matière sèche</sub> en utilisant l'éthanol. Aucune interprétation n'a été proposée. Par ailleurs, Markom *et al.* (2007) ont analysé l'effet du ratio éthanol /eau en tant que cosolvant au CO<sub>2</sub> (10 % cosolvant, 60 °C et 20 MPa) sur la masse totale extraite et la masse de quelques composés particuliers (l'acide gallique, l'acide ellagique et la corilagine qui comportent une structure oside). La composition éthanol: eau a varié suivant EtOH-H<sub>2</sub>O 30-70 %, EtOH-H<sub>2</sub>O 50-50 %, EtOH-H<sub>2</sub>O 70-30 %. Plus le cosolvant est riche en eau, plus grandes sont les masses extraites totales et en chacun des phénols (augmentation d'un facteur 2 à 3 pour les phénols).

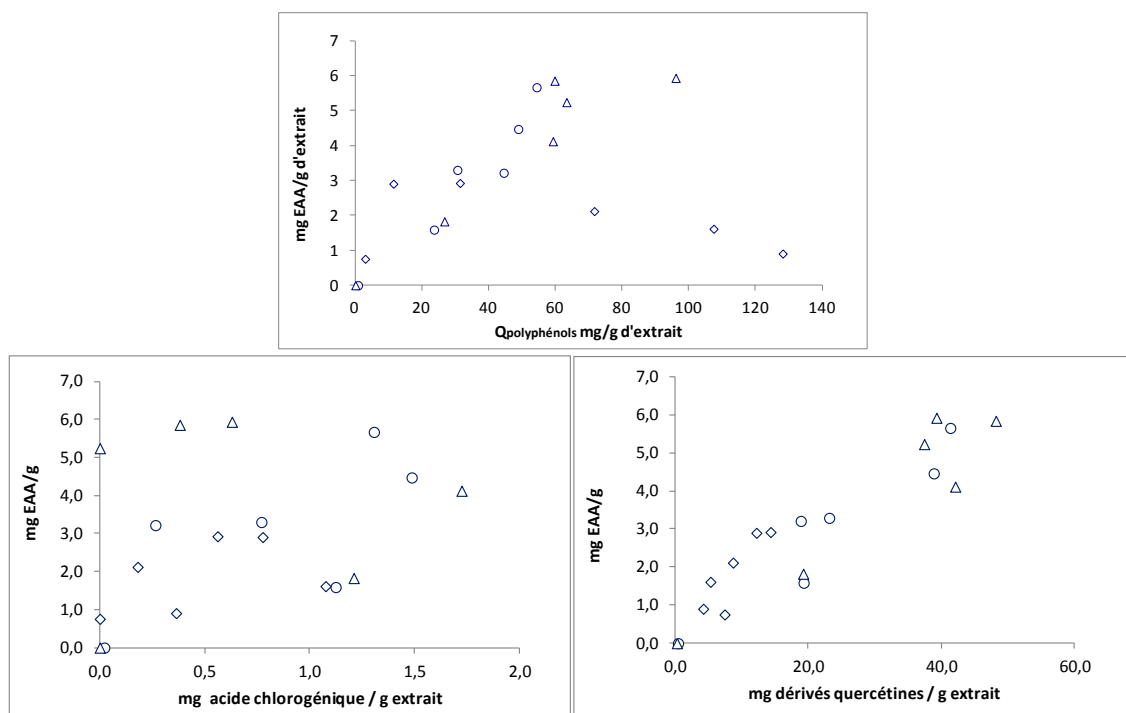
Pour les essais réalisés à 27-30 °C, rappelons que c'est la proportion entre le CO<sub>2</sub> et le cosolvant qui varie alors que le ratio éthanol/ H<sub>2</sub>O reste constant. Nous ne commenterons pas les tendances pour les composés catéchine et phloridzine à cause des très faibles quantités extraites (respectivement inférieures à 1 mg et 3 mg). Une tendance générale à tous les polyphénols est qu'augmenter la proportion de cosolvant au détriment de celle du CO<sub>2</sub> augmente la quantité extraite, ce qui est cohérent avec le comportement observé à 50 °C. Il est délicat de quantifier plus précisément les tendances puisqu'il faut tenir compte de la variabilité introduite par la différence de lots d'où proviennent les pommes. Néanmoins les courbes normalisées (Figures 127 et 128)



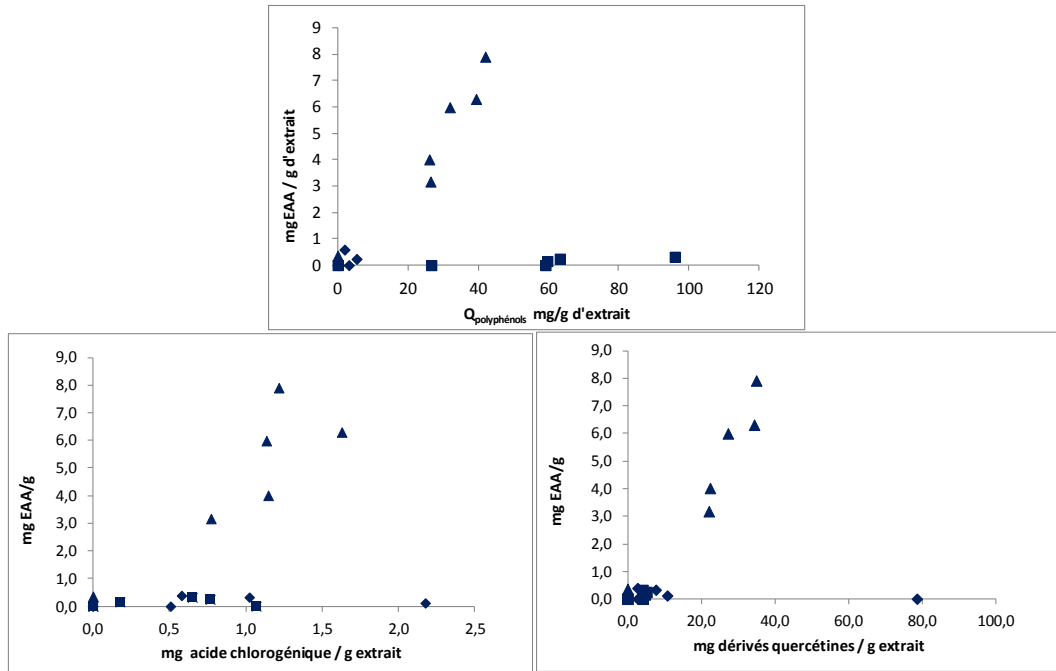
montrent clairement que plus le fluide est pauvre CO<sub>2</sub> (donc riche en cosolvant), plus rapide est l'extraction et ceci est vrai pour tous les polyphénols.

En termes de capacité antioxydante à 50 °C (Figure 129), plus la proportion de cosolvant augmente moins la capacité antioxydante est corrélée avec la quantité de d'acide chlorogénique ou de dérivés quercétines, soit respectivement  $r^2_{\text{acide chlorogénique}} / r^2_{\text{quercétines}} = 0,905/0,480$  ;  $r^2_{\text{acide chlorogénique}} / r^2_{\text{quercétines}} = 0,876/0,897$  ;  $r^2_{\text{acide chlorogénique}} / r^2_{\text{quercétines}} = 0,755/0,188$  pour EFS 13/14, EFS 17 et 18. Néanmoins, si l'ensemble des 3 jeux de données est étudié, nous observons une bonne tendance de l'activité antioxydante avec la teneur en dérivés quercétine de l'extrait.

Pour les essais à 28 °C, seul EFS 10 présente des corrélations positives entre l'activité antioxydante et les polyphénols des fractions (Figure 130). La non corrélation de EFS 22 et EFS 24 n'est pas due à la composition du fluide mais à une plus faible teneur en polyphénols dans la matière première pomme.



**Figure 129:** Test de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux, acide chlorogénique ou dérivés quercétines à 50 °C. ○ EFS 13/14 – 74:23:3 % molaire 30 g, △ EFS 17 – 72:19:9 % molaire CO<sub>2</sub>:EtOH:H<sub>2</sub>O, ◇ EFS 18 – 50,4:43,5:6,1 % molaire 30 g.



**Figure 130 :** Tests de corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux, acide chlorogénique ou dérivés quercétines à 28 °C. ▲ EFS 10 – 74:23:3 % molaire 23 g, ■ EFS 22 – 49:45:6 % molaire 30 g, ◆ EFS 24 – 34:58:8 % molaire 30 g.

#### I.5.4. Influence de la polarité du solvant

Un essai supplémentaire a été conduit en mode dynamique, mais en diminuant cette fois ci la polarité du fluide extractant via une augmentation de la proportion de CO<sub>2</sub> de 77 % mol de à 88 % molaire (EFS 9/11 vs EFS 29, Tableau 32). Les lots utilisés pour EFS 9/11 et EFS 29 sont différents. Comme mis en évidence précédemment, le lot n°3 contient environ 25 % en moins de polyphénols que le lot n°1.

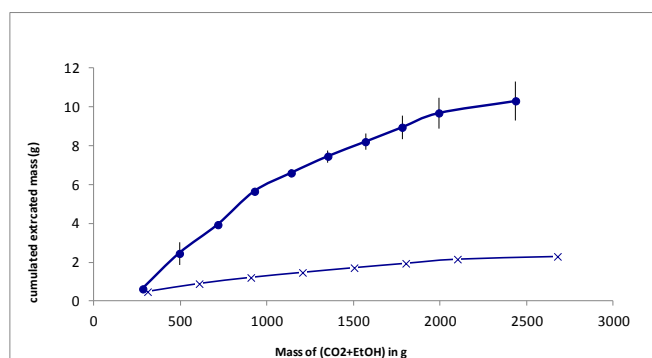
**Tableau 32 :** Paramètres EFS dans l'effet de la polarité du solvant;  $P = 25 \text{ MPa}$ , 30 g de pelures broyées, protocole dynamique, à 50 °C.  
%mol : pourcentage molaire

EFS	Charge	T°	Protocole	Composition %mol (CO <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O)	Nombre de fractions	M <sub>totale extraite</sub>	M <sub>fluide</sub>	Lot pommes
EFS 9/11	28,5 ± 1,5 g	50°C	dynamique	76,4 ± 1 : 20,8 ± 0,8 : 2,8 ± 0,1	F0 à F9	10,3 ± 1 g	2436 ± 60 g	1
EFS 29	30,8 g	50°C	dynamique	87,7 : 10,8 : 1,5	F0 à F7	2,31 g	2677 g	3

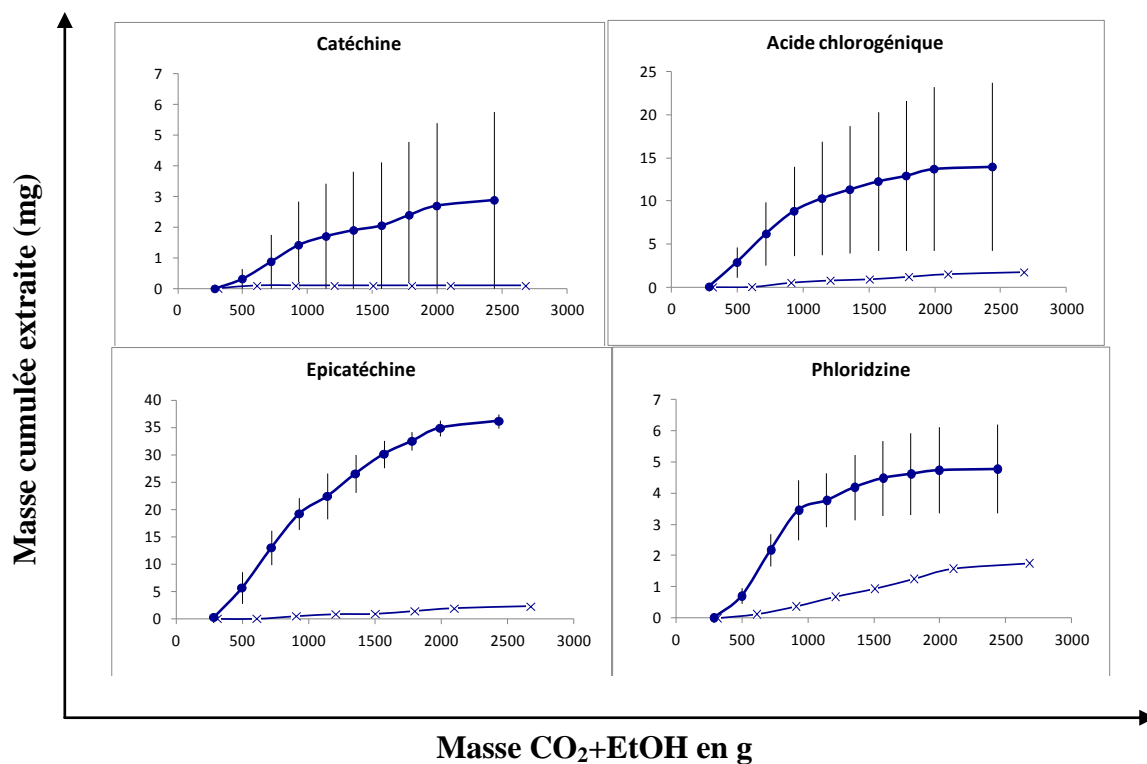
Les Figures 131 et 132 montrent qu'utiliser seulement 13 % de cosolvant dans le fluide extractant (au lieu des 25 % ou plus que nous avons utilisé précédemment) nuit à l'extraction globale et des polyphénols. La masse globale est 5 fois moins extrait et les polyphénols de 3 à 5 fois moins. Cela qui est significativement bien plus important que les 25 % d'écart observés sur la teneur initiale.

En termes de cinétiques (Figure 133), la vitesse est plus lente mais constante, sauf pour la quercétine-galactoside où les vitesses sont du même ordre.

De trop fortes proportions en CO<sub>2</sub> dans le fluide extractant ne permettraient pas d'extraire de façon optimale les polyphénols car nous extrayons peu en utilisant beaucoup de fluide. Même si cela devrait être validé par un essai réalisé sur le même lot, l'idée initiale d'utiliser au minimum 25 % de cosolvant trouve ici sa justification.



*Figure 131 : Effet de la polarité du fluide sur la masse extraite cumulée à 50 °C ; P = 25 MPa, 30 g de pelures broyées, protocole dynamique. ● EFS 9/11, × EFS 29. (n=2, écart à la moyenne)*



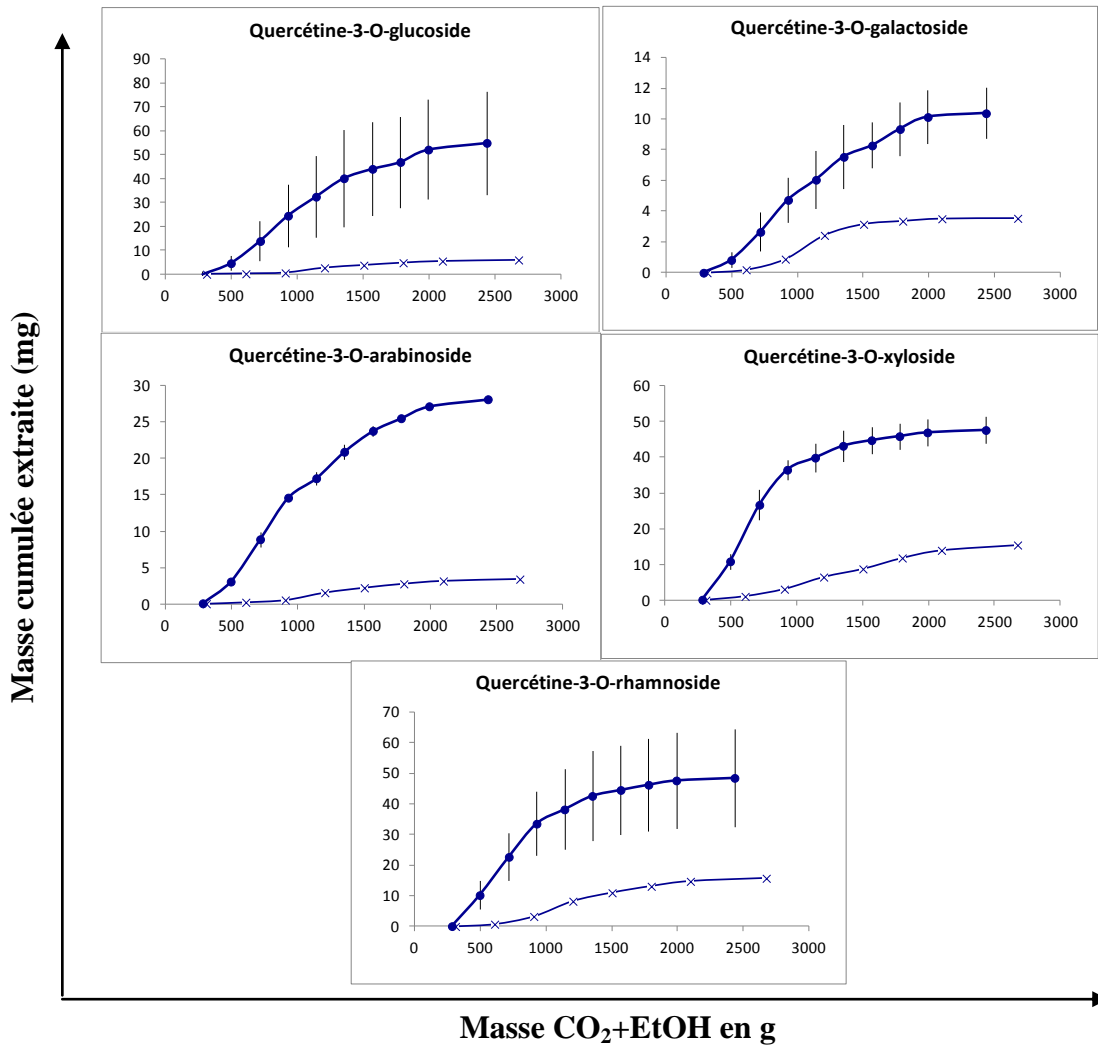


Figure 132 : Effet de la teneur en CO<sub>2</sub> du fluide sur la masse extraite cumulée de chaque polyphénols à 50 °C ; P = 25 MPa, 30 g de pelures broyées, protocole dynamique. ● EFS 9/11 (76 % molaire de CO<sub>2</sub>), × EFS 29 (87 % molaire CO<sub>2</sub>). (n=2, écart à la moyenne)

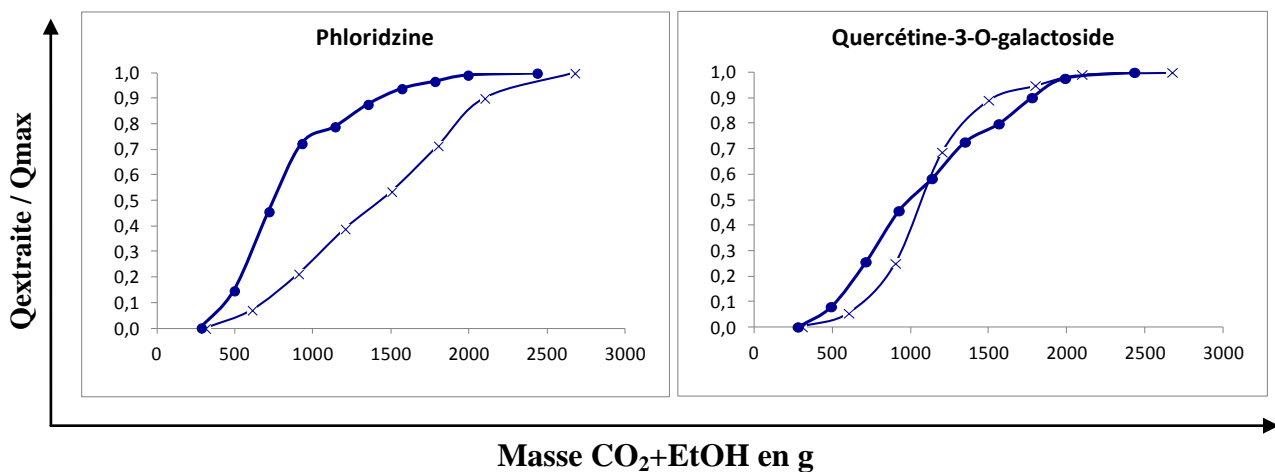


Figure 133 : Cinétique d'extraction des polyphénols à 50 °C ; P = 25 MPa, 30 g de pelures broyées, protocole dynamique : ● EFS 9/11 (76 % molaire de CO<sub>2</sub>), × EFS 29 (87 % molaire CO<sub>2</sub>). L'annexe Figure 157 contient les courbes des autres polyphénols.

## **I.6. Conclusions sur l'impact des paramètres d'extraction supercritique sur la composition et la quantité des extraits obtenus**

Le but de ce travail était d'évaluer le potentiel de l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique à extraire des polyphénols de coproduits de fruit, les épidermes de pommes lyophilisées. Comparée aux autres études de la littérature, l'étude identifie et quantifie les polyphénols majeurs extraits, la cinétique d'extraction des polyphénols, la quantité globale extraite et l'étude de plusieurs paramètres du process (quantité de matrice chargée dans le réacteur, introduction d'une période statique dans l'extraction, composition du fluide).

Tous les principaux polyphénols connus pour être présents dans l'épiderme de pomme sont extraits dans les conditions choisies initialement, soient CO<sub>2</sub>+25 % mol d'éthanol, 25 MPa, 50 °C, y compris les dérivés de quercétines glycosilées (à base sucre). Les extractions sont effectuées en collectant des fractions à un temps défini par le volume de perçage de l'éthanol (premiers millilitres de cosolvant apparaissant dans le collecteur) pour améliorer la description des cinétiques. Cela permet de montrer que l'extraction des polyphénols commence rapidement sans noter de délai entre les différents composés, indiquant qu'ils sont tous rapidement disponibles. A la fin de la durée de l'extraction, l'épuisement de la matrice n'est généralement pas atteint, excepté pour les essais réalisés à partir de 15 g chargés où un net ralentissement voir un plateau dans la courbe d'extraction apparaît après 1,8 kg de fluide passé, c'est à dire pour un ratio solvant/matrice de 120.

L'augmentation de la masse chargée n'augmente pas les quantités extraites dans le même ratio, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses telles qu'un fluide déjà presque saturé avec les molécules extractibles contenues dans 15 g de charge, une organisation non optimale du lit constitué par les particules de charge et les billes, un régime permanent d'extraction non encore établi ou une combinaison de ces facteurs.

L'introduction de périodes statiques pourrait permettre aux composés de diffuser dans la matière. Pour les polyphénols, la différence sur la quantité extraite n'est pas tellement significative, alors que sur les extraits globaux, les conditions statiques mènent à une plus faible extraction. Bien que chaque polyphénol réponde différemment à l'effet du protocole, les différences ne sont pas assez significatives pour classer les polyphénols en groupe.

Les autres effets ont pour certains été en partie comparés via des extractions réalisées sur des lots de pommes différents, ce qui introduit une variable supplémentaire, rendant l'interprétation plus complexe.

Le prétraitement thermique de blanchiment à 80 °C sur les épidermes frais de pommes n'a pas amélioré la quantité de polyphénols extraits, ce qui signifie que les enzymes PPO et POD ne sont pas responsables d'une éventuelle dégradation lors de l'extraction (même en présence d'eau

dans le fluide extractant). La taille des morceaux d'épidermes a une incidence sur le rendement d'extraction, mais les résultats devraient être confirmés sur un même lot de pommes. Si les quantités extraites sont nettement moindres sur grains grossiers (4 mm), la quantité maximale extraite est nettement plus rapide avec ces grains grossiers qu'en dynamique sur grains fins (< 1 mm) qui est la combinaison la moins efficace.

La dernière série d'essais a consisté à améliorer la solubilité des polyphénols en jouant sur la température et la composition du fluide.

Une température faible ralentit notablement l'extraction pour les essais réalisés en mode dynamique, ce qui est compatible avec l'effet de la température sur les processus de transfert de matière ou sur une diminution de la solubilité. En mode statique, l'effet est peu notable, avec toutefois une meilleure extraction de certains dérivés quercétine à 28 °C. Pour l'effet de composition, l'augmentation de la teneur en eau dans le cosolvant à composition CO<sub>2</sub>-cosolvant constante, pénalise légèrement les quantités extraites, c'est-à-dire que davantage de matière est obtenue quand le fluide est "dépourvu d'eau". Les résultats montrent également qu'une augmentation de la teneur en cosolvant se traduit par une augmentation des quantités extraites. Nous pouvons penser que c'est alors la solubilité qui gouverne l'extraction.

Plus généralement, l'extraction par fluide supercritique a permis d'extraire des polyphénols à un taux de 120 mg pour 15 g de pelures avec seulement 1,1 kg de fluide extractant. Comparé à des extraits méthanol/acétone/eau ou éthanol, les dérivés de quercétine obtenus dans les extraits EFS sont particulièrement abondants puisqu'ils représentent environ 75-80 % massique au lieu de 50 % lors d'une macération avec 100 % d'éthanol. Cependant, les polyphénols constituent moins de 5 % de l'extrait global, un faible pourcentage inhérent à l'utilisation de l'éthanol qui n'est pas sélectif et est un bon solvant pour beaucoup de molécules. Les extraits supercritiques ont une forte activité antioxydante. En dépit d'une corrélation plutôt bonne entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols des fractions obtenues en statique et une large disparité quand toutes les données sont considérées, indiquent que d'autres composés (autres que les polyphénols identifiés) contribuent à l'activité antioxydante ou bien que tous les polyphénols ne contribuent pas avec une même réponse à l'activité antioxydante. Il a été montré que dans nos fractions, le pool des dérivés quercétines généreraient la réponse antioxydante plutôt que l'acide chlorogénique. Ceci doit être encore affiné.

## II. Extraits issus de pommes biologiques et activité antiproliférative

Plusieurs études menées sur des polyphénols de pommes ont rapporté de puissantes activités antioxydante, anti-inflammatoire et antiproliférative de ces extraits contre des cellules cancéreuses humaines. En effet, les équipes de He *et al.* (2008) et Veeriah *et al.* (2006) ont montré que parmi les polyphénols isolés, la quercétine et la quercétine-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside possèdent une forte activité antiproliférative contre différentes cellules cancéreuses humaines : HepG2 du cancer du foie, MCF-7 du cancer du sein et Caco-2 et HT-29 du cancer du côlon (Serra 2010a). L'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique est une alternative aux techniques d'extractions conventionnelles, qui permet d'extraire un pool de polyphénols et de molécules ayant des propriétés antioxydantes, sans déchets chimiques. Nous avons voulu savoir si les fractions obtenues par extraction au CO<sub>2</sub>+EtOH d'épidermes de pommes *Golden* pourraient avoir des activités biologiques.

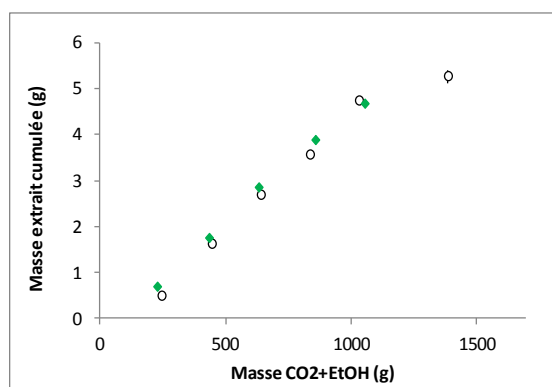
Dans ce contexte, l'objectif de cette partie est d'évaluer les activités cytotoxiques d'extraits supercritiques obtenus à partir de pelures de pommes biologiques, sur une lignée cancéreuse du colon : HT-29. L'utilisation de pommes biologiques permet de s'affranchir des questions relatives aux pesticides contenus dans les épidermes de pommes issus de culture conventionnelle.

Les études d'activité biologique des fractions EFS ont été suivies par M. Hadj Sassi, à l'UMR 5248-CBMN de Bordeaux.

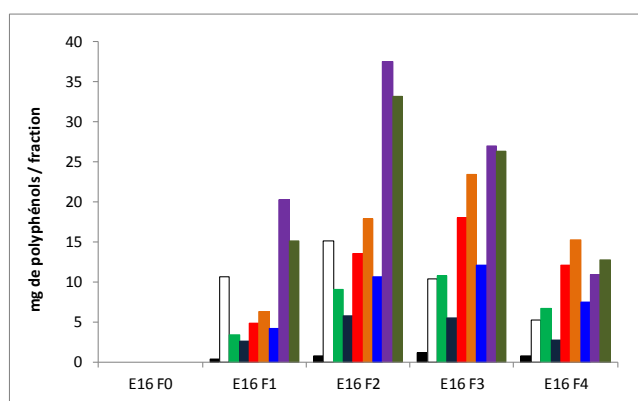
### II.1. Composition en polyphénols et activité antioxydante des extraits issus de pommes biologiques

Les échantillons utilisés pour cette étude sont issus d'épidermes de pommes *Golden Delicious* biologiques dont les polyphénols ont été extraits par FSC et nommés EFS 16 de F0 à F5. Les conditions d'obtention de EFS 16 sont les suivantes :  $F_{CO_2} = 6,9 \pm 0,7$  g/min,  $F_{solvant} = 3,0 \pm 0,2$  ml/min, soit  $74 \pm 2$  % molaire de CO<sub>2</sub> dans le mélange. La charge est de  $29,7 \pm 0,5$  g avec des pelures lyophilisées et broyées, en protocole statique avec des étapes statique de 30 min.

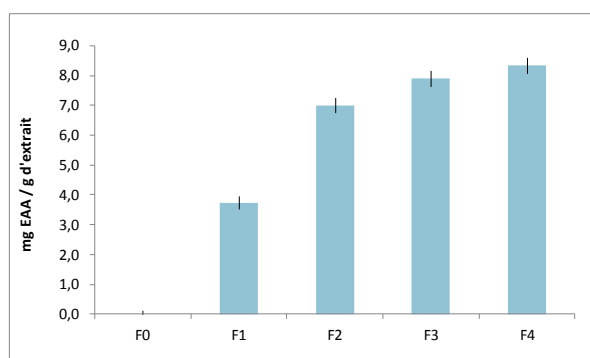
Par comparaison avec EFS 13/14 réalisées dans les mêmes conditions sur des pommes classiques, l'extraction à partir de pommes Bio conduit à une légère augmentation de la masse extraite tout au long de l'extraction, qui malgré tout reste du même ordre de grandeur (Figure 134). De plus le profil polyphénolique de EFS 16 est semblable à celui de EFS 13/14 et contient tous les polyphénols, de F1 à F5. Nous remarquons que les fractions F2 et F3 sont les plus riches en polyphénols (Figure 135). La capacité antioxydante est présente dans F2 et F3 et cette activité est corrélée aux dérivés de quercétine mais non à l'acide chlorogénique avec respectivement  $r^2 = 0,862$  et  $r^2 = 0,483$  (Figures 136 et 137).



*Figure 134: Masse extraite globale cumulée, exprimée en mg, en fonction de la masse de fluide extractant (g). ○ EFS 13/14, ◆ EFS 16. Certains écarts à la moyenne pour EFS 13/14 sont trop faibles pour être visibles.*

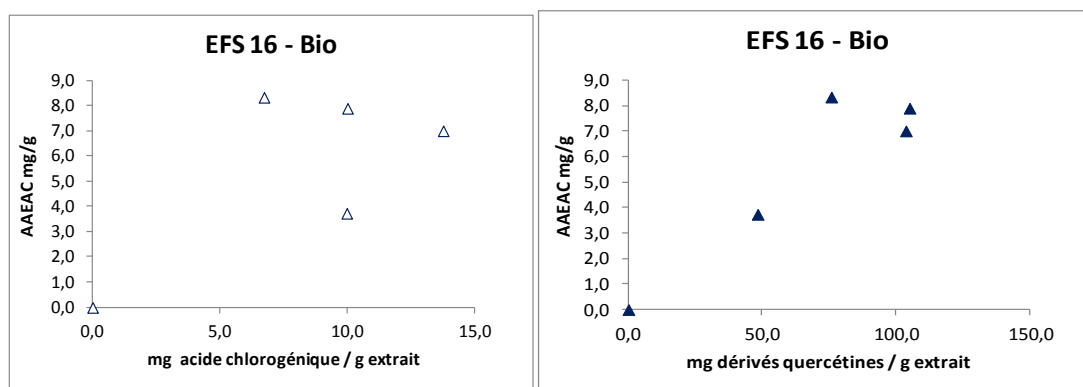


*Figure 135: Profil polyphénolique des fractions collectées en EFS 16, à 25 MPa, 50 °C et CO<sub>2</sub>+25 % EtOH, procédure statique, 30 g de pelures de pommes broyées. ■ Catéchine, □ Acide chlorogénique, ■ Epicatéchine, ■ Phloridzine, ■ Quercétine-glucoside, ■ Quercétine-galactoside, ■ Quercétine-arabinoside, ■ Quercétine-xyloside (éq. Q-Ara), ■ Quercétine-rhamnoside (éq. Q-Ara).*



*Figure 136 : Capacité antioxydante exprimée en mg EAA/g d'extrait pour chacune des fractions extraites en EFS 16. (n=18, écart type)*





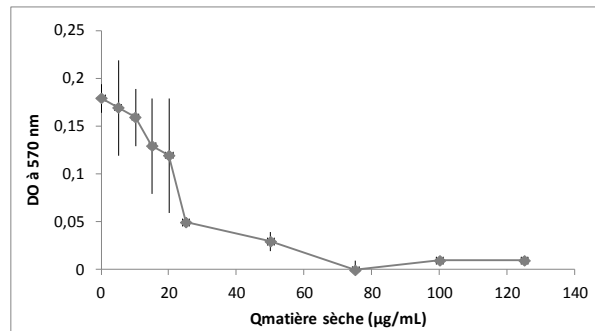
*Figure 137: Tests de corrélation entre la capacité antioxydante et la quantité d'acide chlorogénique en mg Δ et la quantité totale de dérivés quercétines ▲ (en mg à 50 °C).*

## II.2. Activité antiproliférative des extraits de pommes biologiques

Les extraits obtenus par extraction au CO<sub>2</sub> supercritique sont stockés dans de l'éthanol à 96 %. Puisque les cellules vont être inoculées avec un aliquot de l'extrait éthanolique, il a fallu d'abord évaluer l'effet de la concentration d'éthanol (exprimée en volume d'éthanol/volume du milieu de culture) sur la prolifération cellulaire. Les tests de sensibilité à l'éthanol des cellules ont permis de limiter le taux d'éthanol à 1 %, qui n'affecte pas significativement la prolifération de la lignée HT-29. Cette concentration est donc appliquée pour les expériences suivantes. Les fractions brutes supercritiques ont été concentrées 5 fois par évaporation sous azote d'un volume déterminé puis le surnageant a été récupéré par centrifugation. Le surnageant est ensuite inoculé directement sur les cellules.

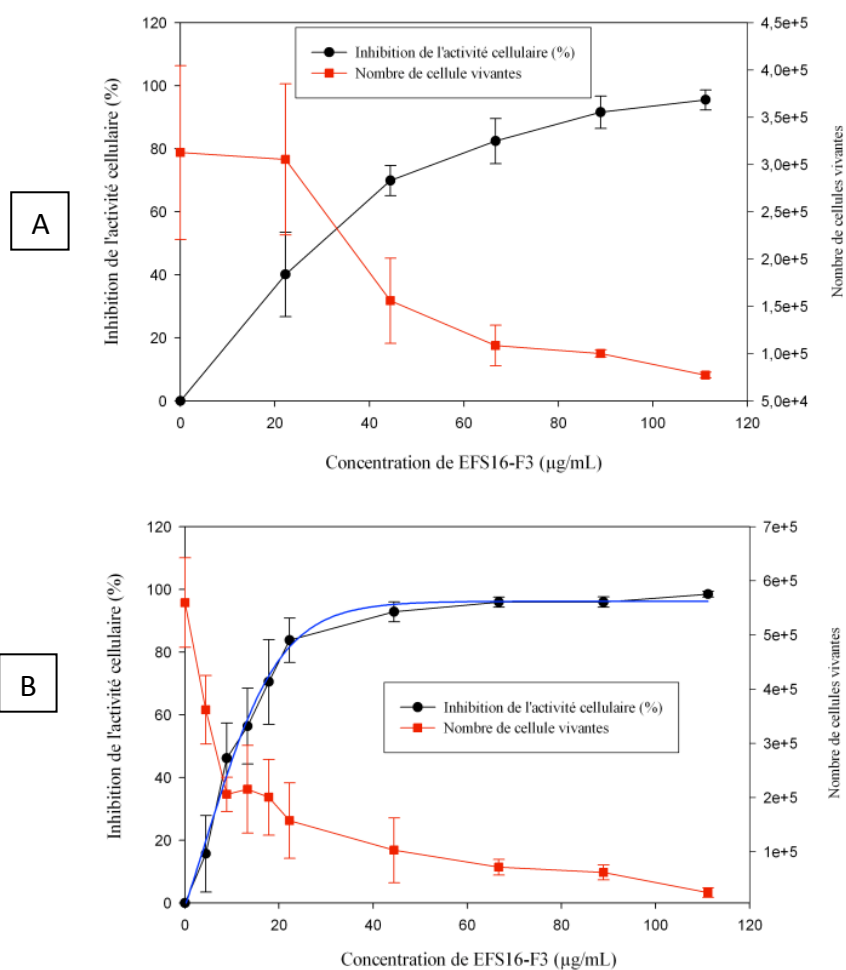
Les résultats montrent que les extraits obtenus à partir de tranches de pomme (incluant épiderme et parenchyme) n'ont aucun effet significatif sur la prolifération de HT-29. L'effet inhibiteur n'est observé qu'avec les extraits provenant uniquement d'épiderme de pommes. Une première série d'investigations sur des fractions obtenues sous diverses conditions opératoires ont montré que les fractions qui présentent une inhibition de la croissance se situent entre F1 et F4, avec un maximum d'activité inhibitrice pour la fraction F3. Les actifs ayant une activité proliférative se trouvent donc dans les fractions obtenues à partir de 0,87 kg de fluide extractant. La fraction F0 ne présente pas d'activité significative, malgré une concentration inoculée de 300 µg/ml (résultat non montré). Les fractions F0 sont obtenues lors de la mise en régime (la première collecte après l'étape statique en CO<sub>2</sub> pur) et nous avons vu précédemment que cette fraction est généralement dépourvue de polyphénols et ne montrent pas d'activité antioxydante. Elle ne présente pas non plus d'activité antiproliférative. A concentration globale d'extrait équivalent pour toutes les fractions, il est fort probable que les composés polaires présents dans l'épiderme soient responsables de l'activité antiproliférative observée, soit grâce à la présence d'un seul composé, soit en conséquence d'un effet synergique de plusieurs molécules. Pour la fraction F3 la

plus active, nous avons inoculé différentes concentrations de EFS 16-F3 aux cellules HT-29 et l'estimation de la viabilité cellulaire a été testée par la technique MTT à 570 nm (Figure 138). Plus le nombre de cellules vivantes va être important, plus la DO à 570 nm sera élevée. De ce fait, nous constatons que la fraction F3 se caractérise par une diminution de la croissance cellulaire dès 80 µg/ml d'extrait inoculé.



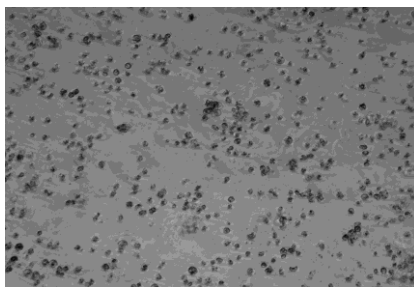
*Figure 138 : Densité optique à 48 h après ajout des différentes concentrations de EFS 16 – fraction F3 pour la méthode MTT. (écarts types)*

Etant donné que la fraction F3 issue d'épidermes de pommes biologiques est celle qui présente l'effet inhibiteur le plus important, nous avons approfondi l'étude pour cet échantillon. L'inhibition de la croissance et de la viabilité cellulaire est fonction de la concentration et du temps d'incubation (Figure 139). Une forte mortalité cellulaire est observée essentiellement après 72 h de contact avec l'extrait dont le milieu est renouvelé toutes les 24 h (non représentée). Cependant, dès 48 h d'inoculation, l'extrait entraîne une baisse du nombre de cellules, associée à une mortalité cellulaire. L'inhibition de l'activité obtenue après 48 h d'incubation permet de déterminer la concentration  $EC_{50}$ , qui est la concentration efficace pour obtenir 50 % de toxicité et qui est évaluée par la diminution de la viabilité cellulaire et par la baisse du nombre de cellules. Dans le cas de EFS16-F3, l' $EC_{50}$  est égal à 10,70 µg/mL (Figure 139-B). Cette concentration est inférieure à celles obtenues avec d'autres extraits de plante, par exemple le « Chardon-Marie » (Hogan 2007) ou un extrait de framboise riche en polyphénols (Ross 2007) dont les  $EC_{50}$  respectifs sont  $EC_{50\text{-Chardon Marie}} = 38 \text{ µg/mL}$  à  $72 \text{ µg/mL}$  selon la lignée cellulaire utilisée, et  $EC_{50\text{ Framboise}} = 21 \text{ µg/ml}$  sur des cellules HeLa (cancer cervical humain).



*Figure 139 : Pourcentage d'inhibition de l'activité cellulaire et du nombre de cellules vivantes avec les différentes concentrations de EFS16-F3, après 24 h (A) et 48 h (B).*

Généralement, un effet antiprolifératif s'accompagne d'un arrêt de la croissance sans perte de la viabilité cellulaire. Cependant ce n'est pas le cas ici. C'est pour cette raison que les tests suivants se sont portés sur la détermination de la cause de cette mortalité. Une mort cellulaire liée à une apoptose ou à une perturbation métabolique pourrait être à l'origine de la baisse de la viabilité cellulaire associée à une diminution du nombre de cellules. L'observation microscopique des cellules montre que celles-ci deviennent rondes avant de se détacher (Figure 140). De plus, l'inhibition est irréversible puisque ces cellules détachées sont incapables de proliférer de nouveau. Ce phénomène a été montré de deux façons différentes : d'une part, ces cellules flottantes ont été récupérées et ajoutées à un nouveau milieu sans extrait et d'autre part, le milieu a été remplacé par un milieu dépourvu d'extrait. Dans les deux cas, il n'y a pas eu de reprise de la croissance.

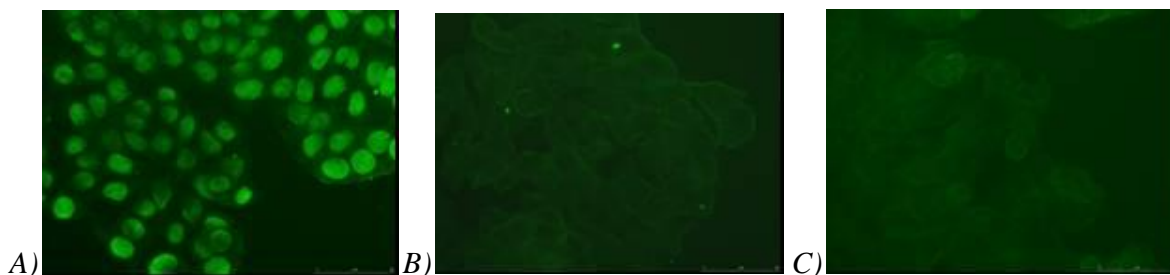


*Figure 140 : Observation microscopique des cellules après inoculation des extraits supercritiques après 72 h.*

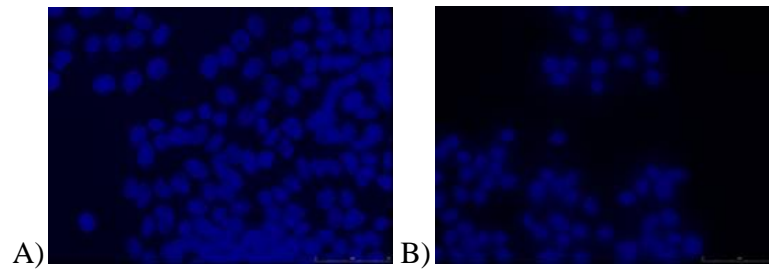
Par rapport aux modifications morphologiques des cellules observées en présence des extraits (cellules rondes puis détachement), nous émettons l'hypothèse que le/les composés de EFS 16-F3 agiraient par apoptose induisant la mort cellulaire.

L'utilisation de la méthode TUNEL et la coloration des noyaux (Hoechst) indiquent que la mort cellulaire n'est pas une conséquence de l'effet apoptotique. En effet, la coloration TUNEL a pour principe de mettre en évidence par fluorescence les dégradations de l'ADN (Figure 141, dégradations de l'ADN en vert sur la photo). Les photos présentées indiquent que l'ADN des cellules exposées pendant 6 h avec l'extrait F3 n'est pas dégradé car aucune fluorescence n'est observée. De plus (Figure 142), les noyaux observés par microscopie suite à la coloration de Hoechst ne sont pas déformés par apoptose. Ces deux tests montrent bien que la mort cellulaire n'est pas une conséquence de l'apoptose.

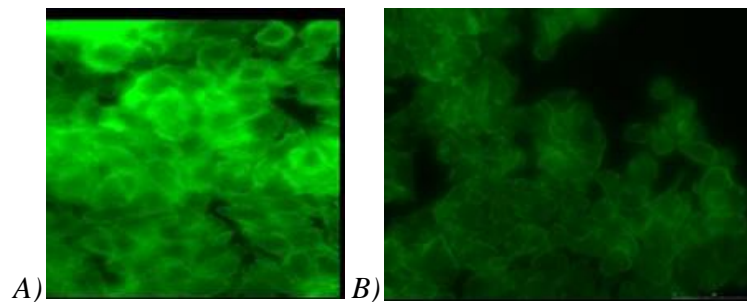
Par contre, la coloration et l'observation de l'actine F, constituant majeur du cytosquelette, font apparaître une déstructuration de ce constituant (Figure 143) car les fibres d'actine F sont dans le témoin positif colorées en vert clair alors que les cellules inoculées avec la fraction F3 de l'extrait supercritique ne présentent aucune coloration. La sonde fluorescente ne se fixe pas sur l'actine F. De ce fait, les composés de la fraction F3 auraient modifié et/ou déstructuré les molécules d'actine F, ne permettant plus aux cellules HT-29 de se fixer. En effet, l'actine F (comme filament) a un rôle de maintien de la structure de la cellule et la transformation des villosités.



*Figure 141 : Coloration TUNEL. A) témoin positif ; B) témoin négatif ; C) cellules exposées pendant 6 h à 22,15 µg/mL de EFS16-F3.*



*Figure 142: La coloration de Hoechst. A) témoin ; B) cellules exposées pendant 6 h à 22,15 µg/mL de EFS16-F3.*



*Figure 143 : Coloration de l'actine F. A) Témoin ; B) Cellules exposées pendant 6 h à 22,15 µg/mL de EFS16-F3.*

Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent, d'une part, que le/les principes actifs responsables de l'activité cytotoxique sont situés en plus grande concentration dans l'épiderme de pommes que dans le parenchyme ou qu'ils sont simplement présents et d'autre part, que les fractions qui présentent l'effet cytotoxique le plus élevé sont les fractions F3 obtenues généralement suite au passage d'environ 0,87 kg de fluide extractant. Cette fraction induit un fort pourcentage de mortalité cellulaire au bout de 72 heures et la concentration permettant d'atteindre 50 % de mortalité cellulaire ( $EC_{50}$ ) est de l'ordre de 11 µg/mL. Les autres fractions étant moins actives, nous pouvons conclure que l'extraction par  $CO_2+EtOH$  permet donc un fractionnement et une concentration des composés. La cytotoxicité cellulaire ne semble pas être liée à un effet apoptotique. L'hypothèse en découlant serait que la déstructuration de l'actine F induirait une perte d'adhésion cellulaire (fibre de tension) ou une inhibition de la division cellulaire. Par contre, il a été mis en évidence que la déstructuration de l'actine F est responsable d'une modification morphologique profonde, qui semble être irréversible, entraînant un décollement et une mort cellulaire.

Les perspectives de ce travail sont la caractérisation de/des substances responsables de cet effet et d'identifier leur mode d'action. Par exemple, Serra *et al.* (2010b) rapportent que l'alcool

perillylique, un monoterpène, est connu pour inhiber la prolifération des cellules HT-29. Ce composé se trouve dans les extraits obtenus avec CO<sub>2</sub>:EtOH (90:10, v/v) après un prétraitement au CO<sub>2</sub> pendant 1 h et présentant une activité antiproliférative sur les cellules cancéreuses du colon HT-29.

Il serait également intéressant de tester cet extrait sur des cellules non issues d'une lignée cancéreuse afin de voir si l'extrait se comporte de la même façon.

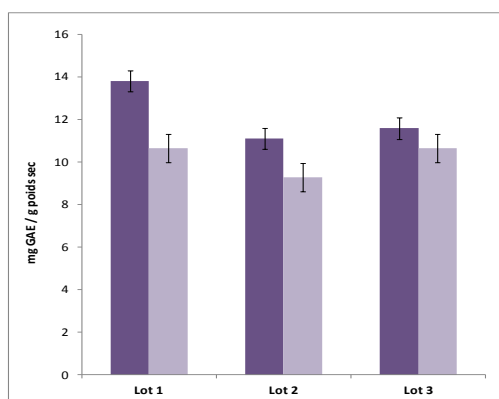
### III. Caractérisation des résidus CO<sub>2</sub> supercritiques

Les extractions présentées au cours de ce chapitre nous ont permis de montrer que les fractions obtenues dans les diverses conditions contiennent des polyphénols en faible quantité, globalement moins de 5 % de la masse totale extraite. Ces fractions ont cependant des activités antioxydantes et antiprolifératives importantes et intéressantes dans le domaine de la santé.

En revanche, le résidu, la matrice pomme restant dans le réacteur après extraction FSC, est sous forme de poudre sèche (environ 2 % d'eau) et pourrait être aussi intéressant à valoriser. Cette forme sèche est un avantage de l'EFS, contrairement à une macération où le résidu est imbibé et en suspension dans le solvant. Le flux final de CO<sub>2</sub> pur élimine l'éthanol de la matrice et retourne à l'état gazeux à pression atmosphérique.

#### III.1. Composition en polyphénols et en sucres des résidus FSC

Les polyphénols dans les matières premières pommes lyophilisées et les résidus FSC peuvent être quantifiés par une méthode globale appelée Folin-Ciocalteu. Les fractions obtenues par extraction au CO<sub>2</sub>+EtOH supercritiques sont valorisables par leur activité antioxydante et antiproliférative. Les résidus restants dans le réacteur peuvent également être valorisés puisqu'ils contiennent encore beaucoup de molécules antioxydantes et notamment des polyphénols (Figure 144).



*Figure 144 : Quantité de polyphénols totaux en mg équivalent acide gallique des résidus FSC en fonction des lots de pommes Golden utilisés. ■ Matière première épidermes de pommes, ■ Résidus FSC. (n=18, écart type)*

Par ailleurs, après extraction, le réacteur est vidé et nous nous sommes aperçus que les billes de verre étaient collantes, ce qui suppose que des sucres ont été extraits des épidermes de pommes. De ce fait, un dosage des sucres a été réalisé sur les matières premières et les résidus FSC (Tableau 33). Pour les sucres simples tels que le glucose et le fructose, les teneurs retrouvées dans les résidus sont plus faibles que dans la matrice initiale. Il semblerait donc que l'extraction par CO<sub>2</sub>/EtOH/H<sub>2</sub>O (72:24.7:3.3) à 50 °C et 25 MPa et la macération par éthanol à 45 °C aient

solubilisé les sucres et les auraient extraits, ce qui nous permet de dire qu'une partie de la masse globale (non identifiée) dans les fractions pourrait être des sucres. En revanche, ces résultats montrent que l'éthanol n'est pas plus sélectif que le CO<sub>2</sub> vis-à-vis des sucres car les quantités de sucres retrouvés dans les résidus après les deux extractions sont du même ordre de grandeur. En ce qui concerne les pommes issues d'une culture biologique, une diminution de la teneur en fructose est significativement observée. D'après ces résultats, il semblerait que seules les molécules à faible poids moléculaire soient extraites et que les sucres plus complexes comme l'amidon et le saccharose soient de trop fort poids moléculaires pour être extraits. L'extraction par CO<sub>2</sub>+EtOH supercritique pourrait également cliver les liaisons entre le fructose et le glucose composant le saccharose ou les liaisons entre les molécules de glucose dans l'amidon.

**Tableau 33 :** Dosages des sucres sur les matières premières « épidermes de pommes Golden » et des résidus obtenus par extraction CO<sub>2</sub> supercritique.

MF : Matière fraîche

Echantillon	Amidon	Glucose éq. $\mu\text{mol GLU/mg MF}$	Fructose	Sucrose
<b>Matière 1ère épidermes</b>	16 $\pm$ 1	3671 $\pm$ 77	6098 $\pm$ 127	1076 $\pm$ 127
<b>Résidu EFS</b>	14 $\pm$ 1	2134 $\pm$ 95	2900 $\pm$ 128	1158 $\pm$ 128
<b>Résidu macération</b>	13 $\pm$ 1	2201 $\pm$ 46	3010 $\pm$ 56	924 $\pm$ 56
<b>Matière 1ère épidermes BIO</b>	16 $\pm$ 1	2269 $\pm$ 28	4160 $\pm$ 43	1422 $\pm$ 43
<b>Résidu EFS BIO</b>	14 $\pm$ 1	2223 $\pm$ 36	2940 $\pm$ 45	1154 $\pm$ 45

Enfin, les résidus après extraction sont également friables et très secs (environ 2 % d'eau), c'est-à-dire qu'ils peuvent être très facilement utilisés pour une autre application, notamment en tant qu'ingrédient alimentaire. Pour ce faire, il est nécessaire de vérifier si, lors d'une remise en eau mimant la réincorporation dans une matrice alimentaire, les résidus FSC brunissent. Autrement dit, une extraction par CO<sub>2</sub>+EtOH supercritiques pendant 6 heures à 50 °C et 25 MPa a-t-il pu inactiver les enzymes PPO et POD ?



### III.2. Activité de l'enzyme PPO

*Tableau 34 : Paramètres des extractions EFS 15 et EFS 27 dont les résidus ont été utilisés pour l'évolution de la couleur en milieu aqueux ; P = 25 MPa, protocole statique, à 50 °C.*

EFS	Charge	T°	Blanchiment	Protocole	Composition %mol (CO <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O)	Nombre de fractions	M <sub>totale</sub> extraite	M <sub>fluide</sub>	Lot pommes
EFS 15	15 g	50°C	non	statique	75,2 : 21,8 : 3	F0 à F5	3,81 g	1432 g	1
EFS 27	30,3 g	50°C	oui	statique	67,5 : 28 : 5,4	F0 à F5	6,24 g	1188 g	3

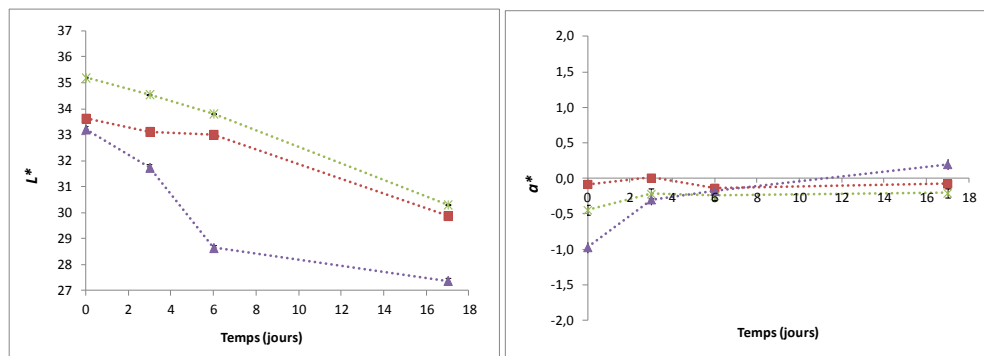
Nous nous sommes posés la question de savoir si un traitement en FSC à 25 MPa 50 °C, aurait permis d'inactiver les enzymes responsables du brunissement et de la dégradation des polyphénols. L'extraction par CO<sub>2</sub>+EtOH supercritiques pourrait elle être une alternative au blanchiment d'épidermes de pommes lyophilisées ? Les travaux de Chakraborti *et al.* (2014), mettent en évidence une dénaturation des enzymes à très haute pression, soit 200 MPa. Cependant, d'autres auteurs ont étudiés l'inactivation des enzymes contenues dans des jus de fruits, dans des conditions de pression plus basses. Ainsi les pectinestérases sont inactivées dès 13 MPa/36 °C (Fabroni 2010) et l'ajout de 2 % d'éthanol (v/v) en tant que cosolvant permettrait d'augmenter l'efficacité de l'inactivation de l'enzyme, en altérant la conformation du site actif et résultant d'une réduction de l'activité catalytique des enzymes (Iftykar 2014). D'autre part, la polyphénoloxydase est également sensible au CO<sub>2</sub>, avec une inactivation complète dans les jus de pommes après 10 min à 22 MPa et 60 °C (Xu 2011), ainsi que dans le jus de melon à 35 MPa et 55 °C (Chen 2011). L'activité de la PPO du jus de pommes est réversible en fonction de la pression en CO<sub>2</sub> appliquée (Gui 2006). Les travaux de Manzocco *et al.* (2014) précisent qu'un traitement au CO<sub>2</sub> inactive la PPO en augmentant la formation de fragments protéiques par dénaturation thermique. Toutes les études ont été réalisées sur des matrices liquides mais aucune n'a traitée de l'inactivation des enzymes dans des matrices solides contenant très peu d'eau.

Pour notre étude, la matrice utilisée est le résidu FSC, c'est-à-dire des épidermes de pommes lyophilisés et broyés. Le contenu en eau ne dépasse pas 2 %. Les résidus supercritiques EFS 27 et EFS 15 sont remis en eau pendant 17 jours et analysés en termes de couleur, de potentiel antioxydant global et de polyphénols totaux. Le résidu FSC 27 est issu du lot n°3, c'est-à-dire qu'il contient moins de polyphénols que le résidu FSC 15, issu du lot n°1 (Tableau 34). Ceci a été vérifié par un dosage Folin-Ciocalteu qui met en évidence une quantité de polyphénols totaux respective de 17 mg GAE/g poids sec et 14 mg GAE/g poids sec pour les résidus FSC 15 et FSC 27. De plus, les épidermes de pommes *Golden* composant FSC 27 ont été blanchis, les enzymes responsables de la dégradation des polyphénols ont donc été inactivées thermiquement à 80 °C pendant 20 min (témoin positif). Un témoin de pelures de pommes lyophilisées a été étudié en

parallèle, celui-ci n'a pas du tout été traité en  $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$  supercritique et il est issu du lot n°3 (témoin négatif).

D'après les données de couleur présentées Figure 145, le paramètre  $L^*$  diminue mais les valeurs de  $a^*$  restent constantes pour les résidus FSC comparées au témoin négatif, ce qui signifie que des résidus FSC remis en eau sont plutôt stables et n'évoluent pas vers un brunissement. Les enzymes responsables de ce brunissement semblent donc être partiellement inactivées par fluides supercritiques car nous observons quand même un changement des paramètres de couleur, qui sont identiques dans le cas d'un blanchiment et d'un traitement  $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$  supercritiques.

Pour comprendre et interpréter de façon plus fine les résultats, la caractérisation doit être plus précise en termes d'identification des polyphénols et de leur quantification, autrement dit il faut analyser les résultats à la lumière des données de composition et concentration issues de l'analyse CLHP. Comme perspectives, il serait intéressant de répéter cette étude de brunissement à d'autres résidus d'extraction au  $\text{CO}_2$  obtenus dans des conditions plus variées afin de confirmer et d'optimiser le traitement  $\text{CO}_2$  cette fois ci dans un objectif d'inhibition d'enzymes.



**Figure 145 :** Evolution des paramètres de couleur  $L^*$  et  $a^*$  des résidus remis en eau sur 17 jours. ■ EFS 27 (+ polyphénols/matrice blanchie), ■ EFS 15 (- polyphénols) et ■ témoin (épidermes de pommes lyophilisées non traités par FSC). Les écarts types sont trop petits pour être visibles. ( $n=10$ )

#### IV. Conclusions de l'extraction des polyphénols par CO<sub>2</sub> supercritique

L'extraction par CO<sub>2</sub>+EtOH supercritiques est une méthode alternative aux autres extractions traditionnelle qui permet de ne pas utiliser de solvants en grande quantité et ne génère pas de déchets chimiques. Le CO<sub>2</sub> peut être recyclé et les quantités de cosolvants EtOH+H<sub>2</sub>O adaptées en fonction de ce que nous cherchons à extraire. Les fractions collectées contiennent des polyphénols, des sucres et d'autres composés qui possèdent des propriétés "antiprolifératives" sur des cellules cancéreuses. Pour la fraction la plus active testée (F3 de EFS 16) et par comparaison avec le peu d'effet qu'ont donné quelques polyphénols individuels testés, il est possible qu'une synergie entre tous les constituants présents, soit responsable de l'activité antioxydante ou de l'activité biologique. Pour progresser, il faudrait réaliser des fractionnements plus poussés, soit au cours de l'extraction supercritique elle même, soit à *posteriori*, utiliser la séparation chromatographique pour collecter des groupes de composés et refaire les tests biologiques sur ces groupes.

Les conditions explorées ici ont mis l'accent sur des paramètres susceptibles d'impacter les transferts de matière (protocole statique vs dynamique, température, granulométrie, charge) et le pouvoir solvant du fluide extractant (composition du fluide, température). Ponctuellement, nous avons vu des effets qui peuvent être différents selon les polyphénols, mais les interprétations restent entachées par le fait que 3 lots de pommes ont été utilisés ce qui a introduit une variable supplémentaire. Néanmoins, la technologie nous a permis d'obtenir des fractions contenant les polyphénols et ayant une activité antioxydante. Ces extraits peuvent être encapsulés ou réintroduits dans des aliments, ainsi que le montrent les nombreux exemples de la littérature.

Les résidus de l'extraction, autrement dit les charges traitées par EFS, peuvent également être valorisés pour leur composition car ils restent encore riches en polyphénols, en sucres et en autres macromolécules qui ne devraient pas être extraites par CO<sub>2</sub> pur. De plus, une première analyse de la remise en eau de ces résidus a montré que ces résidus ne brunissent pas. L'extraction par CO<sub>2</sub>+EtOH aurait permis d'inactiver les enzymes présentes. Ceci devrait être confirmé par des mesures plus poussées d'activité enzymatique. Le résidu pourrait lui aussi servir d'ingrédient fonctionnel, en tant que matrice déjà dépourvue d'enzymes de brunissement actives tout en étant encore riche en polyphénols.



## *Conclusions et perspectives*

---

Les fruits et les légumes sont des aliments difficiles à transformer du fait de leur forte teneur en eau, leur fragilité physique et leur contenu en enzymes. Il faut rapidement les stabiliser afin de pouvoir les utiliser en agroalimentaire en conservant leurs propriétés antioxydantes. Plusieurs méthodes sont appliquées sur les végétaux frais comme les bains d'agents antibrunissements ou le blanchiment pour préserver leurs qualités nutritionnelles. La lyophilisation, le broyage ou même le blanchiment ne sont pas de simples étapes de préparation mais ce sont de réelles étapes de transformation qu'il faut optimiser et maîtriser afin de préserver toutes les propriétés santé des coproduits de fruits et de légumes. En effet, une fois les tissus végétaux altérés, les enzymes vont dégrader les polyphénols et un brunissement va apparaître. C'est pour cette raison que nous avons choisi de stabiliser les épidermes de pommes en les lyophilisant et les broyant une fois secs, afin de les réincorporer de façon plus aisée dans des aliments. La stabilisation par la déshydratation permet de conserver la matrice en l'état, sous forme d'une poudre de pommes riche en polyphénols à 5-7 % d'eau.

Puisque l'utilisation de poudre de pommes comme ingrédient nutritionnel était visée, il était judicieux de s'intéresser au brunissement de ces poudres lorsqu'elles sont mises en contact avec une phase aqueuse. Le suivi par colorimétrie CIELab d'échantillons de poudres de pommes réincorporés dans un milieu aqueux a mis en évidence un brunissement, associé à une réactivation des activités enzymatiques d'oxydation des polyphénols. Une inactivation de l'enzyme est indispensable pour préserver les polyphénols de la matrice végétale, mais également ses propriétés organoleptiques et physiques comme la couleur. Pour contrer ce brunissement, nous avons proposé d'ajouter aux poudres de pommes des agents antibrunissement naturels tels que des jus ou des poudres de fruits, ce qui dans une perspective marché/consommateurs permettrait de conserver une connotation de naturalité à l'ingrédient. Il n'en reste pas moins qu'une solution classique pour inhiber les enzymes responsables du brunissement est un traitement thermique, le blanchiment. Néanmoins, si les températures de blanchiment ne sont pas adaptées et appliquées de façon optimale, une partie des polyphénols et des propriétés nutritionnelles de la pomme sont détruites.

Les essais de ce travail ont été réalisés à échelle laboratoire et non industrielle. Une phase de transfert à échelle pilote puis industrielle est donc nécessaire et devra prendre en compte plusieurs paramètres comme la quantité de matière première, le transfert thermique au sein de cette matière

première et le coût de transformation. De la même façon, l'étude s'est focalisée sur les épidermes de pommes *Golden*, alors que les coproduits de pommes issus par exemple de la transformation en jus, sont des matrices beaucoup plus complexes mélangeant des épidermes, du parenchyme et des pépins (marcs ou gâteaux de presse). Toutes les cellules végétales sont éclatées, les enzymes sont directement en contact avec leurs substrats polyphénoliques. La stabilité et l'arrêt de toutes ces réactions enzymatiques doivent se faire rapidement pour préserver au maximum les polyphénols présents dans la matrice végétale. De plus, chaque fruit et légume est de composition nutritionnelle différente et chaque matrice va réagir de façon différentes aux traitements thermiques, à la préparation et à la transformation (par exemple, la PPO de fraises est inactivée par un blanchiment à 100 °C alors que celle de la pomme est inactive à partir de 80 °C). Chaque étude devra donc tenir compte du végétal étudié.

Les épidermes de pommes *Golden Delicious*, modèle type de coproduits végétaux, non utilisés dans la transformation des pommes, sont une source de polyphénols et d'antioxydants. Cela en fait un ingrédient « santé », utilisable sous forme sèche ou d'extrait riche en molécules d'intérêt. De nombreux auteurs ont d'ailleurs rapporté l'application de plusieurs coproduits en tant qu'ingrédient naturel source d'antioxydants, de fibres et d'autres molécules d'intérêt dans l'agroalimentaire.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence des propriétés plus fonctionnelles des pelures de pommes. Leur composition et leur structure permettent de former des maillages et en font des agents stabilisant d'émulsions. Les particules de pommes lyophilisées se placent aux interfaces d'une émulsion eau/huile permettant la stabilité des gouttelettes. Le matériel de pommes sous forme sèche peut être conservé durablement et être réutilisé comme matériel tensioactif ou matériel fonctionnel (sucrant, épaississant, aromatisant, agent de charge) riche en fibres et polyphénols, incorporable dans des matrices alimentaires. Des résultats prometteurs ont été obtenus, les pelures de pommes sont des agents tensioactifs, tout comme le tourteau de cacao délipidé. Cependant, l'ensemble des essais présentés ne nous permet pas d'établir l'origine exacte des propriétés émulsionnantes des extraits de pomme. L'observation de gouttes non sphériques suggère l'adsorption d'une couche rigide de particules solides à l'interface huile/eau. Le maillage de fibres et de parois végétales dispersées dans un milieu aqueux est susceptible de constituer un réseau gélifié capable de piéger durablement les gouttes d'huile et de stabiliser l'émulsion.

Des études complémentaires visant à mesurer les propriétés rhéologiques des interfaces, la composition biochimique des poudres et la morphologie des particules seront nécessaires pour progresser dans la compréhension de la fonctionnalité de ces milieux complexes. La stabilité physique des émulsions a été caractérisée en suivant l'évolution cinétique de la taille de gouttes et le comportement macroscopique (crémage ou sédimentation). Cependant, il sera intéressant

d'étudier aussi le potentiel antioxydant des poudres en formulant des émulsions à base d'huiles polyinsaturées sensibles à l'oxydation (stabilité chimique). D'autre part, des émulsions de matrices végétales dans les émulsions d'huile polyinsaturées pourront être intéressantes, du fait du pouvoir antioxydant de la pomme sur les acides gras polyinsaturés. Les polyphénols ou autre antioxydants présents dans la pomme peuvent-ils protéger une huile polyinsaturée ? Enfin, il conviendra d'élargir la gamme à d'autres sources végétales hydrophiles ou amphiphiles. Des travaux sont en cours actuellement au CBMN sur d'autres coproduits de transformation comme les tourteaux d'oléagineux (noix), ou bien à partir de graines (lin).

Enfin, l'extraction par  $\text{CO}_2$ +EtOH supercritiques est une méthode alternative aux autres extractions traditionnelles qui permet de ne pas utiliser de solvants en grande quantité. Les polyphénols visés dans ce travail étant des molécules polaires, des mélanges  $\text{CO}_2$ +EtOH ont dû être utilisés pour leur extraction. Le  $\text{CO}_2$  peut être recyclé et les quantités de cosolvants EtOH+ $\text{H}_2\text{O}$  adaptées en fonction de ce que l'on cherche à extraire. L'extraction nous permet d'obtenir des fractions contenant des polyphénols, probablement des sucres et possédant des propriétés « santé » par leur activité antiproliférative sur cellules HT-29. Cet extrait complexe permet une synergie entre les molécules d'intérêt car il ne semble pas qu'un seul groupe de molécules ou de polyphénols soit responsable de toute l'activité antioxydante et de l'activité antiproliférative. Par ailleurs, la valorisation du coproduit pomme peut se poursuivre encore après traitement supercritique, puisque le résidu de matière première est sec, contient encore des polyphénols, et les enzymes PPO et POD ont été inactivées. Ce résidu présenterait donc des caractéristiques intrinsèques lui permettant de servir d'ingrédient fonctionnel.

L'impact des paramètres d'extraction a été mis en évidence par l'exploration de plusieurs conditions telles que la masse chargée, le broyage, le protocole ainsi que la température et la composition du fluide extractant. Dans tous les essais, l'extraction des composés commence rapidement sans délai entre les différents polyphénols, indiquant qu'ils sont tous rapidement accessibles. A la fin de la durée de l'extraction, l'épuisement de la matrice n'est pas atteint, excepté pour les essais réalisés à partir de 15 g charge où un net ralentissement voire un plateau dans la courbe d'extraction apparaît après 1,8 kg de fluide passé, c'est à dire pour un ratio solvant/matrice de 120. L'accroissement de la masse chargée n'augmente pas les quantités extraites dans le même ratio, le fluide serait proche de la saturation avec les extractibles contenus dans 15 g de charge. L'introduction de périodes statiques qui pourraient permettre aux composés de diffuser de la matrice vers le fluide n'a pas amélioré significativement l'extraction des polyphénols. Ce résultat tend à confirmer que le fluide est saturé. Le blanchiment des épidermes de pommes n'a pas d'impact sur les masses extraites de polyphénols. De ce fait, il n'y a aucune dégradation enzymatique des molécules d'intérêt durant l'extraction par FSC. En revanche, la

taille des morceaux d'épidermes semble avoir une incidence sur le rendement d'extraction. Si les quantités extraites sont nettement moindres sur grains grossiers (4 mm). La quantité maximale extraite avec ces grains grossiers est atteinte beaucoup plus rapidement, ce qui est surprenant. L'abaissement de la température ralentit notablement l'extraction, ce qui s'explique par le ralentissement des processus de transfert de matière ou par une diminution de la solubilité. Certains effets ont été étudiés à partir de 3 lots de pommes *Golden* qui présentaient des teneurs très différentes en polyphénols. Les tendances observées doivent être confirmées en utilisant un même lot de fruits, de façon à limiter la variabilité de la matière première. Néanmoins, la cette variabilité est une caractéristique liée à la manipulation de produits d'origine naturelle et par là même des coproduits, cela posera, à l'échelle industrielle, le problème de transposer/adapter les conditions opératoires.

Même dans les conditions d'extraction optimales, les polyphénols constituent moins de 5 % de l'extrait global. Cette faible teneur est inhérente à l'utilisation de l'éthanol qui n'est pas un solvant sélectif. Les extraits supercritiques présentent une forte activité antioxydante mais aussi une large disparité : certaines fractions présentent une corrélation entre la capacité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux ou en dérivés quercétine, mais lorsque l'on considère tous les données, il s'avère que d'autres composés contribuent à l'activité antioxydante, et/ou bien que tous les polyphénols ne contribuent pas avec une même réponse à l'activité antioxydante.

Des pistes doivent être explorées afin d'optimiser la composition de ces fractions et d'accroître le pourcentage de polyphénols dans l'extrait. Il conviendrait d'abord d'utiliser une charge de 15 g de matière première (pour notre réacteur de 0,49 litre) pour ne pas saturer le fluide extractant. L'extraction pourrait être ensuite menée en deux étapes, une première étape en CO<sub>2</sub> pur ou avec par exemple 10 % de cosolvant afin d'extraire des molécules polaires mais non polyphénoliques, puis dans une seconde étape, d'augmenter la proportion de cosolvant pour commencer à extraire les polyphénols. Nous pouvons également jouer sur les conditions de collecte, c'est à dire dépressuriser en deux temps au lieu de collecter tout comme nous le faisons dans notre collecteur.

Le coût économique n'a pas été pris en compte dans cette étude. Il est connu que les coûts d'investissements d'un extracteur par fluides supercritiques sont élevés. Il faudra donc envisager en parallèle de nouvelles techniques pour transformer les végétaux à moindre coût tout en conservant leurs propriétés nutritionnelles, notamment en travaillant avec de l'énergie renouvelable et durable. Le temps de transformation et d'extraction doit également être raccourci afin de préserver les molécules d'intérêts et de d'améliorer le rendement économique. Dans ce cadre, AGROTEC a pour projet de poursuivre les essais afin de définir de nouveaux procédés de transformation des fruits et légumes sous contraintes énergétique et nutritionnelle.



La valorisation des coproduits de pomme en tant qu'ingrédient dans l'agroalimentaire ou la cosmétique semble cependant viable économique, comparés aux produits que l'on peut trouver dans le commerce. Dans ce travail, le coût de transformation estimé de marcs de pomme en poudres est d'environ 16,6 à 32,6 €/kg de matière sèche. Celui d'un extrait supercritique de pomme contenant 5 % de polyphénols est de 200 €/kg d'extrait alcoolique hors conditionnement. Les divers produits à base de pomme trouvés sur le marché actuellement, ont des coûts situés entre 48 €/kg de fibres de pommes en poudre, 100 €/kg d'extrait hydroalcoolique de pommes pour des applications cosmétique et 1 000 €/kg de phloridzine extraite de pépins de pomme.

Les retombées sont positives car les méthodologies et les tests développés permettent à AGROTEC de disposer de connaissances pour appréhender et optimiser la transformation des coproduits végétaux. Toute la difficulté sera de transférer ces connaissances à l'échelle industrielle et d'adapter les protocoles à diverses sources végétales. Chaque végétal est particulier et contient plusieurs types de polyphénols qui ne se comportent pas de la même façon en fonction du type de préparation et de transformation. Il est donc nécessaire d'optimiser les températures de traitements en fonction de la matrice ainsi que le mode d'obtention de l'ingrédient poudre ou liquide. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse sont prometteurs et laissent entrevoir plusieurs voies d'utilisation des coproduits comme compléments alimentaires ou comme additifs fonctionnels en agroalimentaire ou en cosmétique.



## Références bibliographiques

- Acosta-Estrada B.A., Gutierrez-Urbe J.A., Serna-Saldivar S.O. (2014).** Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry* 152: 46–55
- Ajila C.M., Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valero J.R. (2011).** Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerochaete chrysosporium* – Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry* 126: 1071–1080.
- Aka J.P., Courtois F., Louarme L., Nicolas J., Billaud C. (2013).** Modelling the interactions between free phenols, L-ascorbic acid, apple polyphenoloxidase and oxygen during a thermal treatment. *Food Chemistry* 138: 1289–1297.
- Albrecht Rémy (2007).** Co-compostage de boues de station d'épuration et de déchets verts : nouvelle méthodologie du suivi des transformations de la matière organique. *Thèse de l'Université Paul Cézanne, Aix Marseille*.
- Altunkaya A., Gokmen V. (2008).** Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chemistry* 107: 1173–1179.
- Altunkaya A. (2014).** Effect of grape leaf extraction on phenolic profile and browning of fresh-cut lettuce (*Lactuca Sativa*). *Journal of Food Processing and Preservation* 38: 527–534.
- Amaki K., Saito E., Taniguchi K., Joshita K., Murata M. (2011).** Role of chlorogenic acid quinine and interaction of chlorogenic acid quinine and catechins in the enzymatic browning of apple. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 829–832.
- Amrani J.K., Glories Y. (1994).** Etude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 28: 303–317.
- Ananingsih V.K., Sharma A., Zhou W. (2013).** Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International* 50: 469–479.
- Anderson J.W., Baird P., Davis R.H., Ferreri S., Knudtson M., Koraym A., Waters V., William C.L. (2009).** Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Review* 67: 188–205.
- Arabshahi-D S., Devi D.V., Urooj A. (2007).** Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chemistry* 100: 1100–1105.
- Arditty S., Whitby C.P., Binks B.P., Schmitt V., Leal-Calderon F. (2003).** Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions. *European Physical Journal* 11: 273–281.
- Arditty S., Kahn J., Schmitt V., Leal-Calderon F. (2004).** Materials based on solid-stabilized emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 275: 659–664.
- Arditty S., Schmitt V., Lequeux F., Leal-Calderon F. (2005).** Interfacial properties in solid-stabilized emulsions. *European Physical Journal* 44: 381–393.
- Arditty Stéphane (2007).** Fabrication, stabilité et propriétés rhéologiques des émulsions stabilisées par des particules colloïdales. *Thèse de l'Université Bordeaux 1*.

- Asami D.K., Hong Y.J., Barrett D.M., Mitchell A.E. (2003).** Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1237-1241.
- Ashby N.P., Binks B.P. (2000).** Pickering emulsions stabilised by Laponite clay particles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2: 5640-5646.
- Bai X. Zhang H. and Ren S. (2013).** Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace. *Sci Food Agric* 93: 2502–250.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191–203.
- Barkat M., Kadri F. (2012).** Impact de deux modes de cuisson sur la teneur en polyphénols solubles de six légumes. *Revue de génie industriel* 6: 41-45.
- Bernillon S., Guyot S., Renard C.M.G.C. (2004).** Detection of phenolic oxidation products in cider apple juice by high-performance liquid chromatography electrospray ionisation ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 18: 939–943.
- Binks B.P., Lumsdon S.O. (2000a)** Effects of oil type and aqueous phase composition on oil–water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2: 2959-2967.
- Binks B.P., Lumsdon S.O. (2000b).** Catastrophic phase inversion of water-in-oil emulsions stabilized by hydrophobic silica. *Langmuir* 16: 2539-2547.
- Binks B.P., Lumsdon S.O. (2000c).** Influence of particle wettability on the type and stability of surfactant-free emulsions. *Langmuir* 16: 8622-8631.
- Binks B.P., Lumsdon S.O. (2000d).** Transitional phase inversion of solid-stabilized emulsions using particle mixtures. *Langmuir* 16: 3748-3756.
- Binks B.P., Lumsdon S.O. (2001).** Pickering emulsions stabilized by monodisperse latex particles: effects of particle size. *Langmuir* 17: 4540.
- Binks B.P., Clint J.H. (2002).** Solid wettability from surface energy components: relevance to Pickering emulsions. *Langmuir* 18: 1270.
- Binks B.P., Clint J.H., Mackenzie G., Simcock C., Whitby C.P. (2005).** Naturally occurring spore particles at planar fluid interfaces and in emulsions. *Langmuir*, 21: 8161-8167.
- Bisby R.H., Brooke R., Navaratnam S. (2008).** Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry* 108: 1002–1007.
- Boateng J., Verghese M. (2012).** Protective effects of the phenolic extracts of fruits against oxidative stress in human lung cells. *International journal of pharmacology* 8: 152-160.
- Brandy M.L., Cayre O.J., Fakhrullin R.F., Velez O.D., Paunov V.N. (2010).** Directed assembly of yeast cells into living yeastosomes by microbubble templating. *Soft Matter* 6: 3494-3498.
- Brat P., Georgé S., Bellamy A., Du Chaffaut L., Scalbert A., Mennen L., Arnault N., Amiot M.J. (2006).** Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J. Nutr.* 136: 2368–2373.

- Brazinha C.**, Cadima M., Crespo J.G. (2014). Optimization of extraction of bioactive compounds from different types of grape pomace produced at wineries and distilleries. *Journal of Food Science* 79.
- Buckow R.**, Weiss U., Knorr D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure–temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 441–448.
- Cacace J.E.**, Mazza G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59: 379–389.
- Carbone K.**, Giannini B., Picchi V., Lo Scalzo R., Cecchini F. (2011). Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. *Food Chemistry* 127: 493–500.
- Castagnini C.**, Luceri C., Toti S., Bigagli E., Caderni G., Femia A.P., Giovannelli L., Lodovici M., Pitozzi V., Salvadori M., Messerini L., Martin R., Zoetendal E.G., Gaj S., Eijssen L., Evelo C.T., Renard C.M.G.C., Baron A., Dolara P. (2009). Reduction of colonic inflammation in HLA-B27 transgenic rats by feeding Marie Menard apples, rich in polyphenols. *British Journal of Nutrition* 102: 1620–1628.
- Ceymann M.**, Arrigoni E., Scharer H., Nising A.B., Hurrell R.F. (2012). Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis* 26: 128–135.
- Chafer A.**, Berna A., Monton J.B., Munoz R. (2002). High-pressure solubility data of system ethanol (1)+epicatechin (2)+CO<sub>2</sub> (3). *Journal of Supercritical Fluids* 24: 103–109.
- Chafer A.**, Fornari T., Berna A., Stateva R.P. (2004). Solubility of quercetin in supercritical CO<sub>2</sub> + ethanol as a modifier: measurements and thermodynamic modeling. *J. of Supercritical Fluids* 32: 89–96.
- Chakraborty S.**, Kaushik N., Rao P.S., Mishra H.N. (2014). High-pressure inactivation of enzymes: A review on its recent applications on fruit purees and juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13.
- Chanforan Céline** (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. *Thèse de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse*.
- Chang C.H.**, Lin H.Y., Chang C.Y., Liu Y.C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering* 77: 478–485.
- Chatterjee D.**, Jadhav N.T., Bhattacharjee P. (2013). Solvent and supercritical carbon dioxide extraction of color from eggplants: Characterization and food applications. *LWT - Food Science and Technology* 51 : 319-324.
- Chen J.S.**, Balaban M.O., Wei C., Marshall M.R., Hsu W.Y. (1992). Inactivation of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2345-2349.
- Chen J.L.**, Zhang J., Song L., Jiang Y., Wub J., Hub X.S. (2010). Changes in microorganism, enzyme, aroma of hami melon (*Cucumis melo* L.) juice treated with dense phase carbon dioxide and stored at 4 °C. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11:623–629.
- Chiabrando V.**, Giacalone G. (2012). Effect of antibrowning agents on color and related enzymes in fresh-cut apples during cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation* 36: 133–140.

- Chow Y.N.**, Louarme L., Bonazzi C., Nicolas J., Billaud C. (2011). Apple polyphenoloxidase inactivation during heating in the presence of ascorbic acid and chlorogenic acid. *Food Chemistry* 129: 761–767.
- Číž M.**, Luca A., Hasirci V., Sahin S., Sumnu G. (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control* 21: 518–523.
- Colin-Henrion Muriel** (2008). De la pomme à la pomme transformée : Impact du procédé sur deux composés d'intérêt nutritionnel : caractérisation physique et sensorielle des produits transformés. *Thèse de l'Université d'Angers*.
- Dai J.**, Mumper R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313–7352.
- Dangles O.** et al. (2006). Les polyphénols en agroalimentaires : Propriétés chimiques des Polyphénols. *Edition TEC & DOC Lavoisier*, chapitre 2 : 29–54.
- Da Porto C.**, Porretto E., Decorti D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry* 20: 1076–1080.
- Da Porto C.**, Natolino A., Decorti D. (2014). Extraction of proanthocyanidins from grape marc by supercritical fluid extraction using CO<sub>2</sub> as solvent and ethanol–water mixture as co-solvent. *J. of Supercritical Fluids* 87: 59–64.
- Dauchet L.**, Peneau S., Bertrais S., Vergnaud A.C., Estaquio C., Kesse-Guyot E., Czernichow, S. Favier A., Faure H., Galan P., Hercberg S. (2008). Relationships between different types of fruit and vegetable consumption and serum concentrations of antioxidant vitamins. *British Journal of Nutrition* 100: 633–641.
- Davalos A.**, Gomez-Cordoves C., Bartolomé B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J. Agri. Food Chem* 52: 48–54.
- Davidov-Pardo G.**, Moreno M., Arozarena I., Marin-Arroyo M.R., Bleibaum R.N., Bruhn C.M. (2012). Sensory and consumer perception of the addition of grape seed extracts in cookies. *Journal of Food Science* 77.
- De Amicis F.**, Perri A., Vizza D., Russo A., Panno M.L., Bonofiglio D., Giordano C., Mauro L., Aquila S., Tramontano D., Ando S. (2013). Epigallocatechin gallate inhibits growth and epithelial-to-mesenchymal transition in human thyroid carcinoma cell lines. *J. Cell. Physiol.* 228: 2054–2062.
- De Ancos B.**, Gonzalez E.M., Cano M.P. (2000). Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4565–4570.
- De Freitas V.A.P.**, Carvalho E., Mateus N. (2003). Study of carbohydrate influence on proteintannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry* 81: 503–509.
- Demigné C.**, Guyot S., Vaysse P., Ripetti-Ballester V., Kelner J.J., Aprikian O., Manach C., Morand C., Rémésy C. (2003). Le rôle des différents nutriments et de leurs possibles interactions dans les effets santé de la pomme. *Fruits* 58: 297–306.
- Deng G.F.**, Lin X.R., Gao L.L., Xie J.F., Li H.B. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *J. of Functional Food* 5: 260–266.

- Denis M.C.**, Furtos A., Dudonné S., Montoudis A., Garofalo C., Desjardins Y., Delvin E., Levy E. (2013). Apple peels polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *PLoS ONE* 8 (1): e53725. doi:10.1371/journal.pone.0053725.
- Denny A.**, Buttriss J. (2007). Plant foods and health: Focus on plant bioactives : synthesis report No. 4. *European Food Information Resource Consortium* (EuroFIR) ISBN 0-907-66762-7.
- Destribats Mathieu** (2010). Emulsions de Pickering Stimulables. *Thèse de l'Université Bordeaux I*.
- Diaz-Reinoso B.**, Moure A.S., Dominguez H., Parajo J.C. (2006). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2441-2469.
- Ding M.**, Lu Y., Bowman L., Huang C., Leonard S., Wang L., Vallyathan V., Castranova V., Shi X. (2004). Inhibition of AP-1 and neoplastic transformation by fresh apple peel extract. *Journal of Biological Chemistry* 279: 10670-10676.
- Dorobantu L.S.**, Yeung A.K.C., Foght J.M., Gray M.R. (2004). Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6333.
- Du G.**, Li M., Ma F., Liang D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chemistry* 113: 557-562.
- Dudonné S.**, Vitrac X., Coutiere P., Merillon J.M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAc assays. *J Agric Food Chem* 57: 1768-1774.
- Ercelebi E.A.**, Ibanoglu E. (2010). Effects of pectin and guar gum on creaming stability, microstructure and rheology of egg yolk plasma-stabilized emulsions. *Eur Food Res Technol* 231:297-302.
- Etkovic G.C.**, Savatovic S., Anadanovic-Brunet J.C., Djilas S., Vulic J., Mandic A., Etojevic-Simin D.C. (2012). Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food Chemistry* 133: 938-945.
- Everette J.**, Bryant Q., Green A., Abbey Y., Wangila G., Walker R. (2010). Through study of reactivity of various compounds classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8139-8144.
- Farias-Campomanes A.**, Rostagno M., Meireles A. (2013). Production of polyphenols from grape bagasse using supercritical fluids: yield, extract composition and economic evaluation. *J. Supercrit. Fluids* 77: 70-78.
- Fabroni S.**, Amenta M., Timpanaro N., Rapisarda P. (2010). Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 477-484.
- Feliciano R.**, Antunes C., Ramos A., Serra A., Figueira M., Duarte C., De Carvalho A., Bronze M. (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – nutritional, phytochemical and sensory evaluation. *J. of Functional Food* 2: 35-45.
- Ferguson P.J.**, Kurowska E., Freeman D.J., Chambers A.F., Koropatnick D.J. (2004). A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *J. Nutr.* 134: 1529-1535.
- Fernandes I.**, Marques F., De Freitas V., Mateus N. (2013). Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. *Food Chemistry* 141: 2923-2933.



- Ferreira L.A.M., Seiller M., Grossiord J.L., Marty J.P., Wepierre J. (1995a).** Vehicle influence on in vitro release of glucose: w/o, w/o/w and o/w systems compared. *J Control Release* 33: 349–356.
- Ferreira L.A.M., Seiller M., Grossiord J.L., Marty J.P., Wepierre J. (1995b).** In vitro percutaneous absorption of metronidazole and glucose: comparison of o/w, w/o/w and o/w systems. *Int J Pharm* 121: 169–179.
- Figueroa-Espinoza M.C., Zafimahova A., Ivarado P.G.M., Dubreucq E., Poncet-Legrand C. (2015).** Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. *Food Chemistry* 178: 38–44.
- Finkle P., Draper H.D., Hildebrand J.H. (1923).** The theory of emulsification. *J. Am. Chem. Soc.* 45: 2780–2788.
- Fiol M., Adermann S., Neugart S., Rohn S., Mügge C., Schreiner M., Krumbein A., Kroh L.W. (2012).** Highly glycosylated and acylated flavonols isolated from kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) – Structure -antioxidant activity relationship. *Food Research International* 47: 80–89.
- Fiori L., De Faveri D., Casazza A.A., Perego P. (2009).** Grape by-products: extraction of polyphenolic compounds using supercritical CO<sub>2</sub> and liquid organic solvent – a preliminary investigation. *Journal of Food* 7: 163–171.
- Fiori L. (2010).** Supercritical extraction of grape seed oil at industrial-scale: Plant and process design, modeling, economic feasibility. *Chemical Engineering and Processing* 49: 866–872.
- Fogh J., Trempe G. (1975).** New human tumor cell lines. In Human tumor cells “in vitro”. *New York: Plenum Publ. Corp.* 115–141.
- Franks F. (1998).** Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45: 221–229.
- Fromm M., Bayha S., Carle R., Kammerer D.R. (2012).** Characterization and quantitation of low and high molecular weight phenolic compounds in apple seeds. *J. Agric.Food Chem.* 60: 1232–1242.
- Fu L., Xu B.T., Xu X.R., Gan R.Y., Zhang Y., Xia E.Q., Li H.B. (2011).** Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* 129: 345–350.
- Fukumoto L.R., Mazza G. (2000).** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3597–3604.
- Galanakis C. (2012).** Recovery of high added-value components from food wastes: conventional emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology* 26:68–87.
- Gancel A.L., Feneuil A., Acosta O., Mercedes Pérez A., Vaillant F. (2011).** Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International* 44: 2243–2251.
- Garcia E., Barrett D.M. (2002).** Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables. *Edition: Olusola Lamikanra.* Chapter 9: 267–303.
- Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Villares A., Rostagno M.A., Martinez J.A. (2009).** Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* 58:537–552.



- Garmus** T.T., Paviani L.C., Queiroga C.L., Magalhães P.M., Cabral F.A. (2014). Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *J. of Supercritical Fluids* 86: 4–14.
- Gautier** F., Destribats M., Perrier-Cornet R., Dechezelles J.F., Giermanska J., Heroguez V., Ravaine S., Leal-Calderon F., Schmitt V. (2007). Pickering emulsions with stimuable particles: from highly- to weakly-covered interfaces. *Phys.Chem.Chem.Phys.* 9: 6455–6462.
- Gerhauser** C. (2008). Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Medica* 74: 1608–1624.
- Georgé** S., Brat P., Alter P., Amiot M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1370 – 1373.
- Georgé** S., Tourniaire F., Gautier H., Goupy P., Rock E., Caris-Veyrat C. (2011). Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food Chemistry* 124: 1603–1611.
- Golding** J.B., McGlasson W.B., Wyllie S.G., Leach D.N. (2001). Fate of apple peel phenolics during cool storage. *J. Agric. Food Chem.* 49:2283–2289.
- Gui** F., Wu J., Chen F., Liao X., Hu X., Zhang Z., Wang Z. (2006). Change of polyphenol oxidase activity, color, and browning degree during storage of cloudy apple juice treated by supercritical carbon dioxide. *Eur Food Res Technol* 223: 427–432.
- Gui** F., Wu J., Chen F., Liao X., Hu X., Zhang Z., Wang Z. (2007). Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry* 100: 1678–1685.
- Gulcin** I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86: 345–391.
- Guyot** S., Le Bourvellec C., Marnet N., Drilleau J.F. (2002). Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. *Food Science and Technology* 35: 289–291.
- Guyot** S., Marnet N., Sanoner P., Drilleau J.F. (2003). Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6240–6247.
- Guyot** S., Serrand S., Le Quéré J.M., Sanoner P., Renard C.M.G.C. (2007). Enzymatic synthesis and physicochemical characterization of phloridzin oxidation products (POP), a new water-soluble yellow dye deriving from apple. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8: 443–450.
- Hakkim** F.L., Essa M.M., Arivazhagan G., Guizani N., Song H. (2012). Evaluation of food protective property of five natural products using fresh cut apple slice model. *Journal of Biological sciences* 15: 10–18.
- Hasbey Adil** I., Cetin H., Yener M., Bayindirli A. (2007). Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *J. of Supercritical Fluids* 43: 55–63.
- He** X., Liu R.H. (2008). Phytochemicals of apple peels: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9905–9910.
- Henriquez** C., Aliaga C., Lissi E. (2002). Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. *Inc. Int J Chem Kinet* 34: 659–665.

- Henriquez C.**, Speisky H., Chiffelle I., Valenzuela T., Araya M., Simpson R., Almonacid S. (2010). Development of an ingredient containing apple peel, as a source of polyphenols and dietary fiber. *Journal of Food Science* 75.
- Henríquez C.**, Almonacid S., Lutz M., Simpson R., Valdenegro M. (2013b). Comparison of three drying processes to obtain an apple peel food ingredient. *Journal of Food* 11: 127-135.
- Heras-Ramírez M.E.**, Quintero-Ramos A., Camacho-Dávila A.A., Barnard J., Talamás-Abbud R., Torres-Muñoz J.V., Salas-Muñoz E. (2011). Effect of blanching and drying temperature on polyphenolic compound stability and antioxidant capacity of apple pomace. *Food Bioprocess Technol* doi 10.1007/s11947-011-0583-x.
- Herrero M.**, Cifuentes A., Ibanez E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae A review. *Food Chemistry* 98: 136–148.
- Herzi Nejia** (2013). Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles. *Thèse de l'Université de Toulouse*.
- Hogan F.S.**, Krishnegowda N.K., Mikhailova M., Kahlenberg M.S. (2007). Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *Journal of Surgical Research* 143: 58-65.
- Horozov T.S.**, Binks B.P. (2006). Particle-stabilized emulsions: A bilayer or a bridging monolayer ? *Angew.Chem.Int.Ed.* 45: 773–776.
- Huang D.**, Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. *J Agri Food Chem* 50: 1815-1821.
- Huber G.M.**, Rupasinghe H.P.V. (2009). Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts. *Journal of Food Science* 74.
- Iftikhar T.**, Wagner M.E., Rizvi S.S.H. (2014). Enhanced inactivation of pectin methyl esterase in orange juice using modified supercritical carbon dioxide treatment. *International Journal of Food Science and Technology* 49: 804–810.
- Ignat I.**, Volf I., Popa V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126: 1821-1835.
- Ismail A.**, Marjan Z., Foong C. (2004). Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemisty* 87: 581-586.
- Jang J.H.**, Moon K.D. (2011). Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry* 124: 444–449.
- Jelodarian S.**, Ebrahimabadi A.H., Khalighi A., Batooli H. (2012). Evaluation of antioxidant activity of *Malus domestica* fruit extract from Kashan area. *AJP* 2: 139-145.
- Jeong H.L.**, Jin W.J., Kwang D.M., Kee, J. P. (2008). Effects of anti-browning agents on polyphenoloxidase activity and total phenolics as related to browning of fresh-cut 'Fuji' apple. *Food Journal* 15: 79-87
- Jeusti Bof C.M.**, Fontana R.C., Piemolini-Barreto L.T., Sandri I.G. (2012). Effect of Freezing and Processing Technologies on the Antioxidant Capacity of Fruit Pulp and Jelly. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55: 107-114.

- Joshi A.P.K.**, Rupasinghe H.P.V., Khanizadeh S. (2011). Impact of drying processes on bioactive phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of red-fleshed apple splices: drying of red-fleshed apple splices. *Journal of Food Processing and Preservation* 35: 453-457.
- Kahle K.**, Kraus M., Richling E. (2005). Polyphenol profiles of apples juices. *Molecular Nutrition and Food Research* 49: 797-806.
- Kahle K.**, Kempf M., Schreier P., Scheppach W., Schrenk D., Kautenburger T., Hecker D., Huemmer W., Ackermann M., Richling E. (2011). Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *Eur J Nutr* 50: 507–522.
- Kalaiselvi P.**, Rajashree K., Priya L.B., Padma V.V. (2013). Cytoprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against deoxynivalenol-induced toxicity through anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms in HT-29 cells. *Food and Chemical Toxicology* 56: 110–118.
- Kalashnikova I.**, Bizot H., Cathala B., Capron I. (2011). New Pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals (BCN). *Langmuir* 27: 7471–7479.
- Karaman S.**, Tütem E., Baskan K.S., Apak R. (2013). Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties: antioxidant capacity and phenolic content of apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 867-875.
- Kazan A.**, Koyu H., Turu I.C., Yesil-Celiktas O. (2014). Supercritical fluid extraction of *Prunus persica* leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. *J. of Supercritical Fluids* 92: 55–59.
- Kermani Z.J.**, Shpigelman A., Pham H.T., Van Loey A.M., Hendrickx M.E. (2015). Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin as related to its chemical structure. *Food Hydrocolloids* 44: 424-434.
- Klinkesorn U.**, Sophanodora P., Chinachoti P., McClements D.J., Decker E.A. (2005). Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. *Journal of agricultural and food chemistry* 53: 8365-71.
- Klopotek Y.**, Otto K., Bo-HM V. (2005). Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 53: 5640-5646.
- Kolniak-Ostek J.**, Oszmianski J., Wojdyło A. (2013). Effect of apple leaves addition on physicochemical properties of cloudy beverages. *Industrial Crops and Products* 44: 413– 420.
- Kroon P.A.**, Clifford M.N., Crozier A., Day A.J., Donovan J.L., Manach C. Williamson G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr* 80:15–21.
- Kuljarachanan T.**, Devahastin S., Chiewchan N. (2009). Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chemistry* 113: 944–949.
- Kumar S.**, Mishra B.B., Saxena S., Bandyopadhyay N., More V., Wadhawan S., Hajare S.N., Gautam S., Sharma A. (2012). Inhibition of pericarp browning and shelf life extension of litchi by combination dip treatment and radiation processing. *Food Chemistry* 131: 1223–1232.
- Lacampagne Soizic** (2010). Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin : Etude de l'impact de l'organisation physico-chimique des parois cellulaires sur la composante

tannique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux. *Thèse de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2*.

**Lam S., Velikov K., Velev O. (2014).** Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 19: 490–500.

**Laroze L., Diaz-Reinoso, Moure A., Zuniga M. Dominguez H. (2010).** Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. *Eur. Food Res. Technol* 231: 669-677.

**Lata B. (2007).** Relationship between apple peel and the whole fruit antioxidant content: year and cultivar variation. *J. Agric. Food Chem.* 55: 663-671.

**Lata B., Tomala K. (2007b).** Apple peel as a contributor to whole fruit quantity of potentially healthful bioactive compounds cultivar and year implication. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10795-10802.

**Lata B. (2008).** Apple peels antioxidant status in relation to genotype, storage type and time. *Scientia Horticulturae* 117: 45–52.

**Lata B., Trampczynska A., Paczesna J. (2009).** Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae* 121: 176–181.

**Laufenberg G., Kunz B., Nystroem M. (2003).** Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology* 87: 167–198.

**Lavelli V., Corti S. (2011).** Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. *Food Chemistry* 129: 1578–1583.

**Leal-Calderon F., Schmitt V., Bibette J. (2007).** “*Emulsion Science. Basic Principles. 2<sup>nd</sup> version*” Springer, ISBN 978-0-387-39682-8.

**Le Bourvellec C., Bouchet B., Renard C. (2005).** Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1725: 10-18.

**Leccese A., Bartolini S., Viti R. (2009).** Antioxidant properties of peel and flesh in ‘GoldRush’ and ‘Fiorina’ scab-resistant apple (*Malus domestica*) cultivars. *New Zealand J. of Crop and Horticultural Science* 37: 71-78.

**Lester G.E., Lewers K.S., Medina M.B., Saftner R.A. (2012).** Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis* 27: 102–107.

**Li H., Deng Z., Wu T., Liu R., Loewen S., Tsao R. (2012).** Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry* 130: 928–936.

**Li Q., Zhou S., Jing J., Yang T., Duan S., Wang Z., Mei Q., Liu L. (2013).** Oligosaccharide from apple induces apoptosis and cell cycle arrest in HT29 human colon cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 57: 245–254.

**Liu L., Liy Y.H., Niu Y.B., Sun Y., Guo Z.J., Li Q., Li C., Feng J., Cao S.S. and Mei Q.B. (2010).** An apple oligogalactan prevents against inflammation and carcinogenesis by targeting LPS/TLR4/NF-kB pathway in a mouse model of colitis-associated colon cancer. *Carcinogenesis* 31: 1822–1832.

- Long Z.**, Zhao Q., Liu T., Kuang W., Xu J., Zhao M. (2012). Role and properties of guar gum in sodium caseinate solution and sodium caseinate stabilized emulsion. *Food Research International* 49: 545–552.
- López J.**, Uribe E., Vega-Gálvez A., Miranda M., Vergara J., Gonzalez E., Di Scala K. (2010). Effect of air temperature on drying kinetics, vitamin C, antioxidant activity, total phenolic content, non-enzymatic browning and firmness of blueberries variety O'Neil. *Food Bioprocess Technol* 3: 772–777.
- Lopez A.**, Rodriguez-Ramirez Jr, Mendez-Lagunos L.L. (2012). Effects of drying air temperature on the structural properties of garlic evaluated during drying. *International Journal of Food Properties* 16: 1516-1529.
- Lu Y.**, Foo L.Y. (1997). Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry* 59: 187-194.
- Macheix J.-J.**, Fleuriet A., Sarni-Manchado P. (2006). Les polyphénols en agroalimentaires. Chapitre Composés phénoliques dans la plante – structure, biosynthèse, répartition et rôle. *Editions TEC&DOC Lavoisier*.
- MacLean D.D.**, Murr D.P., Deell J.R., Horvath C.R. (2006). Postharvest variation in apple (*malus x domestica* Borkh) flavonoids following harvest, storage, and 1-MCP treatment. *J. Agric. Food Chem.* 54:870-878.
- Malec M.**, Le Quéré J.M., Sotin H., Kolodziejczyk K., Bauduin R., Guyot S. (2014). Polyphenol profiling of a red-fleshed apple cultivar and evaluation of the color extractability and stability in the juice. *J. Agric. Food Chem.* 62: 6944–6954.
- Manach C.**, Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79: 727-47.
- Manach C.**, Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81:230–42.
- Manzocco L.**, Spilimbergo S., Ignat A., Ferrentino G, Panozzo A., Mirolo G., Anese M., Nicoli M.C. (2014). Effect of dense-phase CO<sub>2</sub> on polyphenoloxidase in model Solutions. *International Journal of Food Science and Technology* 49: 1238–1241.
- Maran J.P.**, Priya B., Manikandan S. (2014). Modeling and optimization of supercritical fluid extraction of anthocyanin and phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruit pulp. *Journal of Food Science and Technology* 51: 1938-1946.
- Marc F.**, Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences* 20: 458- 63.
- Markom M.**, Hasan M., Daud W.R.W., Singh H., Jahim J.Md. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn. Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology* 52: 487–496.
- Maróstica M.R.J.**, Leite A.V., Dragano N.R.V. (2010). Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic compounds from natural sources – Review (Supercritical extraction and stabilization of phenolic compounds). *The Open Chemical Engineering Journal* 4: 51-60.
- Marques J.L.**, Della Porta G., Reverchon E., Renuncio J.A.R., Mainar A.M. (2013). Supercritical antisolvent extraction of antioxidants from grape seeds after vinification. *The Journal of Supercritical Fluids* 82: 238–243.



- Martins C.**, Fonseca F., Ballus C., Figueiredo-Neto A., Meinhardt A., De Godoy H.T., Izar M.C. (2013). Commons sources and composition of phytosterols and their estimated intake by the population in the city of Sao Paulo, Brazil. *Nutrition* 29 865-871.
- McHugh T.H.**, Senesi E. (2000) Apple wraps: a novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh cut apples. *Journal of Food Science* 65: 480-490.
- Melo A.A.M.**, Diniz L.T., Simoes A.D.N., Pushmann R. (2014). Fruit juices as an alternative technique for conservation of fresh-cut banana. *Revista Caatinga, Mossoró*, 27: 272 - 279.
- Melo M.M.R.**, Silvestre A.J.D., Silva C.M. (2014b). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *J. of Supercritical Fluids* 92: 115–176
- Mendoza-Wilson A.M.**, Armenta-Vazquez M.E., Castro-Arredondo S.I., Espinosa-Plascencia A., Robles-Burgueno M.R., Gonzalez-Rios H., Gonzalez-Leon A, Balandran-Quintana R.R. (2013). Potential of polyphenols from an aqueous extract of apple peel as inhibitors of free radicals: An experimental and computational study. *Journal of Molecular Structure* 1035: 61–68.
- Miao S.F.**, Yu J.P., Du Z., Guan Y.X., Yao S.J., Zhu Z.Q. (2010). Supercritical fluid extraction and micronization of Ginkgo flavonoids from Ginkgo Biloba leaves. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49: 5461–5466.
- Monsalve-Gonzales A.**, Barbosa-Canovas G.V., Cavalieri R.P., Mcevily A.J., Iyengar R. (1993). Control of browning during storage of apples slices preserved by combined methods. *Journal of Food Science* 58: 797-800.
- Morales-Soto A.**, Garcia-Salas P., Rodriguez-Perez C., Jimenez-Sanchez C., Cadiz-Gurrea M., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutiérrez A. (2014). Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in Andalusia (Spain). *Food Research International* 58: 35-46.
- Moussa-Ayoub T. E.**, El-Samahy S. K., Kroh L. W., Rohn S. (2011). Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. *Food Chemistry* 124: 1177–1184.
- Muanda François Nsemi** (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Thèse de l'Université Paul Verlaine, Metz*.
- Murga R.**, Ruiz R., Beltran S., Cabezas J.L. (2000). Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3408-3412.
- Myers D.** (2006). Surfactant science and technology (*Edition Wiley*).
- Nagy B.**, Simandi B. (2008). Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika. *J. of Supercritical Fluids* 46: 293–298.
- Nicolas J.J.**, Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Amiot M.J., Aubert S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34: 109-157.
- Ojeil A.**, El Darra N., El Hajj Y., Bou Mouncef P., Rizk T.J. et Maroun R.G. (2010). Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin château Ksara. *Lebanese Science Journal* 11.
- Oliveira D.A.**, Salcador A.A., Smania A. Jr, Smanie E.F.A., Maraschin M., Ferreira S.R.S. (2013). Antimicrobial activity and composition profile of grape pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of biotechnology* 164:423-432.

- Omata Y.**, Yoshida Y., Niki E. (2010). Assessment of the antioxidant capacity of natural fruit extracts by inhibition of probe decay and plasma lipid peroxidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 531-535.
- O'Shea N.**, Arendt E., Gallagher E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science and Emerging Technology* 16: 1-10.
- Ozoglu H.**, Bayindirli A. (2002). Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control* 13: 213-221.
- Park M.**, Kim G.H. (2013). The antioxidative and antibrowning effects of citrus peel extracts on fresh-cut apple. *Korean J. Food Sci. Technol.* 45: 598-604.
- Paula J.T.**, Paviani L.C., Foglio M.A., Sousa I.M.O., Duarte G.H.B., Jorge M.P., Eberlin M.N., Cabral F.A. (2014). Extraction of anthocyanins and luteolin from *Arrabidaea chica* by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *Journal of supercritical fluids* 86: 100-107.
- Pays K.**, Giermanska-Kahn J., Pouligny B., Bibette J., Leal-Calderon F. (2002). Double emulsions: how does release occur? *J Control Rel* 79: 193-205.
- Pellegrini N.**, Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition* 133: 2812-19.
- Peng I.W.**, Kuo S.M. (2003). Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations. *J. Nutr.* 133: 2184-2187.
- Pickering S.U.** (1907). Emulsions. *J. Chem. Soc.* 91: 2001-2021.
- Pinelo M.**, Arnous A., Meyer A.S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cellwall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology* 17: 579-590.
- Pinelo M.**, Ruiz-Rodriguez A., Sineiro J., Senorans F.J., Reglero G., Nunez M.J. (2007). Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. *Eur Food Res Technol* 226: 199-205.
- Pinelo M.**, Tress A.G., Pedersen M., Arnous A., Meyer A.S. (2007b). Effect of Cellulases, Solvent Type and Particle Size Distribution on the Extraction of Chlorogenic Acid and Other Phenols from Spent Coffee Grounds. *American Journal of Food Technology* 2: 641-651.
- Pinelo M.**, Zornoza B., Meyer A.S. (2008). Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction. *Separation and Purification Technology* 63: 620-627.
- Pingret D.**, Fabiano-Tixier A.S., Le Bourvellec C., Renard C.M.G.C., Chemat F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering* 111: 73-81.
- Prado J.M.**, Dalmolin I., Carareto N.D.D., Basso R.C., Meirelles A.J.A., Oliveira J.V., Batista E.A.C., Meireles M.A.A. (2012). Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering* 109: 249-257.

- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- Quiles A., Hernando I., Perez-Munuera I., Larrea V., Llorca E., Lluch M.A. (2005).** Polyphenoloxidase (PPO) activity and osmotic dehydration in Granny Smith apple. *J Sci Food Agric* 85:1017–1020.
- Ramsden W. (1903).** Separation of solids in the surface-layers of solutions and 'suspensions' (Observations on surface-membranes, bubbles, emulsions, and mechanical coagulation) - preliminary account. *Proc. R. Soc.* 72: 156-164.
- Rayner M., Marku D., Eriksson M., Sjö M., Dejmeck P., Wahlgren M. (2014).** Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 458: 48–62.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 1231-1237.
- Reis S.F., Rai D.K., Abu-Ghannam N. (2012).** Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. *Food Chemistry* 135: 1991–1998.
- Reis S.F., Rai D.K., Abu-Ghannam N. (2014).** Apple pomace as a potential ingredient for the development of new functional foods. *International Journal of Food Science and Technology*.
- Renard C.M., Baron A., Guyot S., Drilleau J. (2001).** Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules* 29: 115–125.
- Renard C.M.G.C (2005).** Effects of conventional boiling on the polyphenols and cell walls of pears. *J Sci Food Agric* 85: 310–318.
- Renard C.M.G.C., Dupont N., Guillermin P. (2007).** Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. *Phytochemistry* 68: 1128–1138.
- Renard C.M.G.C., Le Quéré J.M., Bauduin R., Symoneaux R., Le Bourvellec C., Baron A. (2011).** Modulating polyphenolic composition and organoleptic properties of apple juices by manipulating the pressing conditions. *Food Chemistry* 124: 117–125.
- Reverchon E., De Marco I. (2006).** Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. of Supercritical Fluids* 38: 146–166.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66: 401-436.
- Rocculi P., Romani S., Rosa M.D. (2004).** Evaluation of physico-chemical parameters of minimally processed apples packed in non-conventional modified atmosphere. *Food Research International* 37: 329–335.
- Roche P.J. (2006).** Preparation of template DNA and labeling techniques. *Methods in molecular biology* édité par Darby I.A et Hewitson T.D., 326: 9-16.
- Rombaut N., Savoie R., Thomasset B., Belliard T., Castello J., Van Hecke E., Lanoiselle J.L. (2014).** Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Chimie* 17: 284–292.



- Romo-Hualde A.**, Yetano-Cunchillos A.I., González-Ferrero C., Sáiz-Abajo M.J., González-Navarro C.J. (2012). Supercritical fluid extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red pepper (*Capsicum annum L.*) by-products. *Food Chemistry* 133: 1045–1049.
- Rosa P.T.V.**, Meireles M.A.A. (2005). Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Engineering* 67: 235–240.
- Ross H.A.**, McDougall G.J., Stewart D. (2007). Antiproliferative activity is predominantly associated with ellagittannins in raspberry extracts. *Phytochemistry* 68: 218–228.
- Roupas P.**, Noakes M. (2010). Apples, their antioxidants and benefits to human health. *CSIRO Food and Nutritional Sciences*.
- Rui O.**, Rodrigues M.F., Bernardo-Gil M.G. (2002). Characterization and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79: 225-30.
- Rupasinghe H.P.V.**, Wang L., Huber G.M., Pitts N.L. (2008). Effect of baking on dietary fiber and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Chemistry* 107: 1217–1224.
- Rupasinghe H.P.V.**, Erkan N., Yasmin A. (2010a). Antioxidant protection of eicosapentaenoic acid and fish oil oxidation by polyphenolic-enriched apple skin extract. *J. Agric. Food Chem.* 58: 1233–1239.
- Rupasinghe H.P.V.**, Yasmin A. (2010b). Inhibition of oxidation of aqueous emulsions of omega-3 fatty acids and fish oil by phloretin and phloridzin. *Molecules* 15: 251-257.
- Rupasinghe H.P.V.**, Erkan N., Yasmin A. (2010c). Antioxidant protection of eicosapentaenoic acid and fish oil oxidation by polyphenolic-enriched apple skin extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 1233-1239.
- Rupasinghe V.**, Kathirvel P., Huber G. (2011). Ultrasonication-assisted solvent extraction of quercetin glycosides from 'Idared' apple peels. *Molecules* 16: 9783-9791.
- Rupasinghe V.**, Thilakarathna S., Nair S. (2012). Polyphenols: chemistry, dietary sources and health benefits. Chapter Polyphenols of apples and their potential health benefits. *Editions: Nova Science Publishers Inc. Hauppauge* 333-368.
- Russell J.T.**, Lin Y., Böker A., Su L., Carl P., Zettl H., He J., Sill K., Tangirala R., Emrick T., Littrell K., Thiagarajan P., Cookson D., Fery A., Wang Q., Russell T.P. (2005). Self-assembly and Cross-linking of Bionanoparticles at Liquid-Liquid Interfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 2420.
- Sacchetti G.**, Cocci E., Pinnavaia G.G., Mastrocola D., Rosa M.D. (2008). Influence of processing and storage on the antioxidant activity of apple derivatives. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 797–804.
- Sakulnarmrat K.**, Fenech M., Thomas P., Konczak I. (2013). Cytoprotective and pro-apoptotic activities of native Australian herbs polyphenolic-rich extracts. *Food Chemistry* 136: 9–17.
- Sánchez-Tena S.**, Alcarraz-Vizán G., Marín S., Torres J.L., Cascante M. (2013). Epicatechin gallate impairs colon cancer cell metabolic productivity. *J. Agric. Food Chem.* 61: 4310–4317.
- Sanoner P.**, Guyot S., Marnet N., Molle D., Drilleau J.F. (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* 47:4847-4853.
- Sarni-Manchado** et Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. *Edition TEC and DOC*.

- Savatović S.M.**, Tepić A.N., Šumić Z.M., Nikolić M.S. (2009). Antioxidant activity of polyphenol-enriched apple juice. *APTEFF* 40: 1-220.
- Scalbert A.**, Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073-2085.
- Schmidt U.S.**, Schmidt K., Kurz T., Endreß H.-U., Schuchmann H.P. (2015). Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water-emulsions. *Food Hydrocolloids* 46: 59-66.
- Schulman J.**, Leja J. (1954). Control of contact angles at the oil-water-solid interfaces. Emulsions stabilized by solid particles (BaSO<sub>4</sub>). *Transactions of the Faraday Society* 50: 598-605.
- Schulze B.**, Hubbermann E.M., Schwarz K. (2014). Stability of quercetin derivatives in vacuum impregnated apple slices after drying (microwave vacuum drying, air drying, freeze-drying) and storage. *LWT - Food Science and Technology* 57: 426-433.
- Sekhon-Loodu S.**, Warnakulasuriya S.N., Rupasinghe H.P.V., Shahidi F. (2013). Antioxidant ability of fractionated apple peels phenolics to inhibit fish oil oxidation. *Food Chemistry* 140: 189–196.
- Serra A.T.**, Matias A.A., Frade R.F.M., Duarte R.O., Feliciano R.P., Bronze M.R., Figueira M.E., De Carvalho A., Duarte C.M.M. (2010a). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 – Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods* 2: 46-53.
- Serra A.**, Seabra I., Braga M., Bronze M., De Sousa H., Duarte C. (2010b). Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *J. Supercritical Fluids* 55: 184-191.
- Serra A.T.**, Rocha J., Sepodes B., Matias A.A., Feliciano R.P., De Carvalho A., Bronze M.R., Duarte C.M.M., Figueira M.E. (2012). Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties - Correlation of response with composition. *Food Chemistry* 135: 2378–2386.
- Singleton V.L.**, Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Shan B.**, Xie J.H., Zhu J.H., Peng Y. (2012). Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. *Food and bioproducts processing* 9: 579–587.
- Soares M.C.**, Ribeiro E.T., Kuskoski E.M., Gonzaga L.V., Lima A., Filho J.M., Fett R. (2008). Composition of phenolic acids content in apple (*Malus* sp) pomace. *Séminaire, Londres* 29: 339-348.
- Sogi D.S.**, Siddiq M., Greiby I., Dolan K.D. (2013). Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of ‘Tommy Atkins’ mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food Chemistry* 141: 2649-2655.
- Son S.M.**, Moon K.D., Lee C.Y. (2001). Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food chemistry* 73: 23-30.
- Stalikas C.D.** (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30: 3268–3295.
- Stefani R.**, Buzzi M., Grazzi R. (1997). Supercritical fluid extraction of pesticide residues in fortified apple matrices. *Journal of Chromatography A* 782: 123-132.

- Suárez-Jacobo A.**, Rüfer C.E., Gervilla R., Guamis B., Roig-Sagués A.X., Saldo J. (2011). Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry* 127: 447–454.
- Subramaniam B.**, Lyon C.J., Arunajatesan V. (2002). Environmentally benign multiphase catalysis with dense phase carbon dioxide. *Applied Catalysis B: Environmental* 37: 279–292.
- Sudha M.L.**, Baskaran V., Leelavathi K. (2007). Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making. *Food Chemistry* 104: 686–692.
- Supapvanich S.**, Pimsaga J., Srisujan P. (2011). Physicochemical changes in fresh-cut wax apple (*Syzygium samarangense* [Blume] Merrill & L.M. Perry) during storage. *Food Chemistry* 127: 912–917.
- Szakiel A.**, Paczkowski C., Pensec F., Bertsch C. (2012). Fruit cuticular waxes as a source of biologically active Triterpenoids. *Phytochem Rev.* 263-284.
- Tabart J.**, Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O., Dommes J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113: 1226-1233.
- Tan B.K.**, Harris N.D. (1995). Maillard reaction products inhibit apple polyphenoloxidase. *Food Chemistry* 53: 267-273.
- Tan Y.**, Xu K., Liu C., Li Y.L., Lua C.G., Wang P.X. (2012). Fabrication of starch- based nanospheres to stabilize Pickering emulsion. *Carbohydrate polymers* 88: 1358-1363.
- Tedajo G.M.**, Bouttier S., Fourniat J., Grossiord J.L., Marty J.P., Seiller M. (2005). Release of antiseptics from the aqueous compartments of a w/o/w multiple emulsions. *Int J Pharm.* 288: 63-72.
- Telli A.**, Mahboub N., Boudjeneh S., Siboukeur O.E.K., Moulti-Mati F. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L) variété Ghars. *Annales des Sciences et Technologie* 2.
- Thaipong K.**, Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis, Biodiversity and nutrition: a common path Biodiversity and nutrition: a common path* 19: 669-675.
- Thilakarathna S.H.**, Wang Y., Rupasinghe H.P.V., Ghanam K. (2012). Apple peel flavonoid- and triterpene-enriched extracts differentially affect cholesterol homeostasis in hamsters. *Journal of Functional Foods* 4: 963-971.
- Torres C.**, Diaz-Maroto M.C., Hermosin-Gutierrez I., Perez-Coello M.S. (2010). Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta* 660: 177–182.
- Tow W.W.**, Premier R., Jing H., Ajlouni S. (2011). Antioxidant and antiproliferation effects of extractable and nonextractable polyphenols isolated from apple waste using different extraction methods. *Journal of Food Science* 76.
- Tsao R.**, Yang R., Young C, Zhu H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 51: 6347–6353.
- Tsao R.**, Yang R., Xie S., Sockovie E., Khanizadeh S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J. Agric. Food Chem.* 53: 4989-4995.

- Tsao R. (2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246.
- Tzoumaki M.V., Moschakis T., Kiosseoglou V., Biliaderis C.G. (2011).** Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles. *Food Hydrocolloids* 25: 1521-1529.
- Turan D., Altay F., Guven E.C. (2015).** The influence of thermal processing on emulsion properties of defatted hazelnut flour. *Food Chemistry* 167: 100–106.
- Turker N., Aksay S., Ekiz H.I (2005).** Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot beverage. *J. Agric. Food Chem* 52: 3807-13.
- Van der Sluis A.A., Dekker M., De Jager A., Jongen W.M.F. (2001).** Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3606-3613.
- Van Der Sluis A.A., Dekker M., Skrede G., Jongen W.M.F. (2002).** Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of Existing Production Methods. *J Agric Food Chem.* 50:7211-9.
- Van Der Sluis A.A., Dekker M., Skrede G., Jongen W.M.F. (2004).** Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 2. Effect of novel production methods. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2840-2848.
- Veeriah S., Kautenburger T., Habermann N., Sauer J., Dietrich H., Will F., Pool-Zobel B.L. (2006).** Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis* 45:164–174.
- Vega-Gálvez A., Scala K.D., Rodríguez K., Lemus-Mondaca R., Miranda M., López J., Perez-Won M. (2009).** Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry* 117: 647–653.
- Vega-Galvez A., Ah-Hen K., Chacana M., Vergara J., Martinez-Monzo J., Garcia-Segovia P., Lemus-Mondaca R., Di Scala K. (2012).** Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chemistry* 132: 51-59.
- Veggi P.C., Cavalcanti R.N., Meireles M.A.A. (2014).** Production of phenolic-rich extracts from Brazilian plants using supercritical and subcritical fluid extraction: Experimental data and economic evaluation. *Journal of Food Engineering* 131: 96–109.
- Venkatachalam K., Meenune M. (2012).** Changes in physiochemical quality and browning related enzyme activity of longkong fruit during four different weeks of on-tree maturation. *Food Chemistry* 131: 1437–1442.
- Verdu Cindy (2013).** Cartographie Génétique des Composés Phénoliques de la Pomme. *Thèse de l'Université d'Angers*.
- Vieira F.G.K., Di Pietro P.F., Da Silva E.L., Borgesa G.S.C., Nunes E.C., Fett R. (2012).** Improvement of serum antioxidant status in humans after the acute intake of apple juices. *Nutrition Research* 32: 229–232.
- Vignati E., Piazza R., Lockhart T. (2003).** Pickering emulsions: interfacial tension, colloidal layer morphology, and trapped-particle motion. *Langmuir* 19: 6650-6656.

- Viuda-Martos M.**, Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Sendra E., Sayas-Barberá E., Pérez-Álvarez J.A. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International* 44: 1217–1223.
- Viuda-Martos M.**, Perez-Álvarez J.A., Sendra E., Fernandez-Lopez J. (2012). In vitro antioxidant properties of pomegranate (*Punica Granatum*) peel powder extract obtained as coproduct in the juice extraction process. *Journal of Food Processing and Preservation*. doi:10.1111/j.1745-4549.2012.00715.x
- Walia M.**, Rawat K., Bhushan, Padwada Y.S., Singh B. (2014). Fatty acid composition, physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activity of apple seed oil obtained from apple pomace. *J Sci Food Agric* 94: 929–934.
- Wang C.C.**, Chu C.Y., Chu K.O. (2004). Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clinical Chemistry* 50.
- Wang H.**, Cao G., Prior R. (1996). Total antioxydant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 701-705.
- Wang L.**, Weller C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17: 300–312.
- Wang X.**, Chen Q., Lü X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids* 38: 129-137.
- Waterhouse G.I.N.**, Wang W., Sun-Waterhouse D. (2014). Stability of canola oil encapsulated by co-extrusion technology: effect of quercetin addition to alginate shell or oil core. *Food Chemistry* 142: 27-38.
- Wei Y.**, Ji B., Zhou F., Zhang D., Liu Y. (2012). Technology optimization of polyphenols extraction from apple pomace. *Source of the Document Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*. 28: 345-350.
- Wolfe K.L.**, Liu R.H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1676–1683.
- Wimmer Z.**, Zarevúcka M. (2010). A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 233-253.
- Xia E.Q.**, Deng G.F., Guo Y.J., Li H.B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 622-646.
- Xu Z.**, Zhang L., Wang Y., Bi X., Buckow R., Liao X. (2011). Effects of high pressure CO<sub>2</sub> treatments on microflora, enzymes and some quality attributes of apple juice. *Journal of Food Engineering* 104: 577–584.
- Yanishlieva N.V.**, Marinova E.M. (2001). Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103: 752–767.
- Yi J.H.**, Li M.B., Zhu Z.B. (2013). Influence of apple polyphenols on the properties of polyphenol oxidase. *Modern Food science and Technology* 29: 2601-2606+2620.
- Yilmaz C.**, Gökmen V. (2013). Compositional characteristics of sour cherry kernel and its oil as influenced by different extraction and roasting conditions. *Industrial Crops and Products* 49: 130-135.
- Yoruk R.**, Marshall M.R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphénol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry* 27: 361-422.



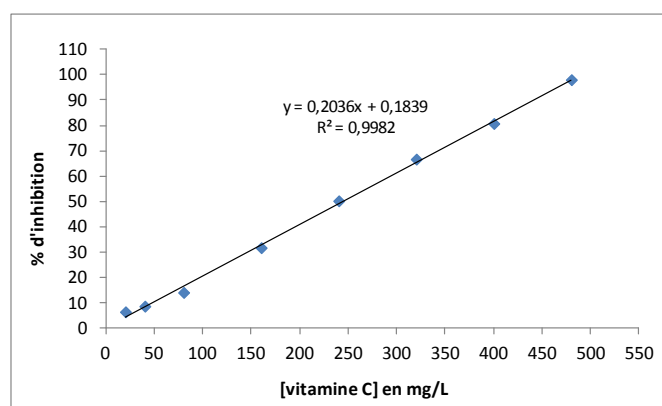
- Yussoff A., Murray B.S. (2011).** Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions. *Food hydrocolloids* 25: 42-55.
- Zabot G.L., Moraes M.N., Petenate A.J., Meireles M.A.A. (2014).** Influence of the bed geometry on the kinetics of the extraction of clove bud oil with supercritical CO<sub>2</sub>. *J. of Supercritical Fluids* 93: 56–66.
- Zhang M., Wang F., Liu R., Tang X., Zhang Q., Zhang Z. (2014).** Effects of superfine grinding on physicochemical and antioxidant properties of Lycium barbarum polysaccharides. *LWT - Food Science and Technology* 58: 594-601.
- Zhao Q., Zhao M., Yang B., Cui C. (2009).** Effect of xanthan gum on the physical properties and textural characteristics of whipped cream. *Food Chemistry* 116: 624–628.
- Zheng H.Z., Kim Y.L., Chung S.K. (2012).** A profile of physicochemical and antioxidant changes during fruit growth for the utilisation of unripe apples. *Food Chemistry* 131: 106–110.
- Zhou J., Wadhwa S.S. (2013).** Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Dongxiao Sun-Waterhouse Food Control* 32: 450-460.
- Zhu Y., Pan Z., McHugh T.H., Barrett D.M. (2010).** Processing and quality characteristics of apple slices processed under simultaneous infrared dry-blanching and dehydration with intermittent heating. *Journal of Food Engineering* 97: 8–16.
- Ziberna L., Tramer F., Moze S., Vrhovsek U., Mattivi F., Passamonti S. (2012).** Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. *Free Radical Biology & Medicine* 52: 1750–1759.
- Zibetti A.W., Aydi A., Livia M.A., Bolzan A., Barth D. (2013).** Solvent extraction and purification of rosmarinic acid from supercritical fluid extraction fractionation waste: Economic evaluation and scale-up. *J. of Supercritical Fluids* 83 : 133– 145.
- Zill-e-Huma Huma (2010).** Hydrodiffusion assistée par micro-ondes. Nouvelle technique d'eco-extraction d'antioxydants. *Thèse de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse*.
- Zocca F., Lomolino G., Lante A. (2011).** Dog rose and pomegranate extracts as agents to control enzymatic browning. *Food Research International* 44: 957–963.
- Zulueta A., Esteve M.J., Frigola A. (2009).** ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114: 310-316.

---

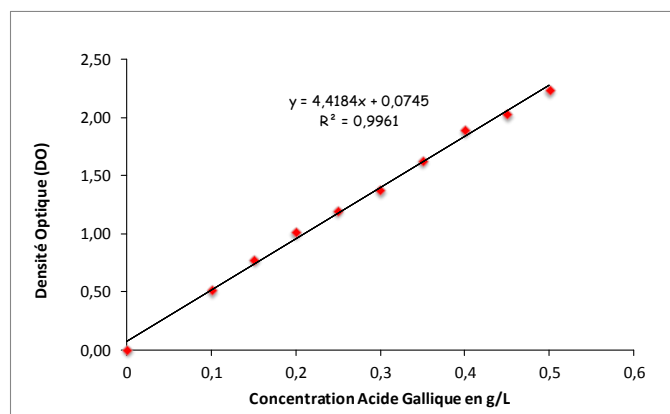
## Annexes

---

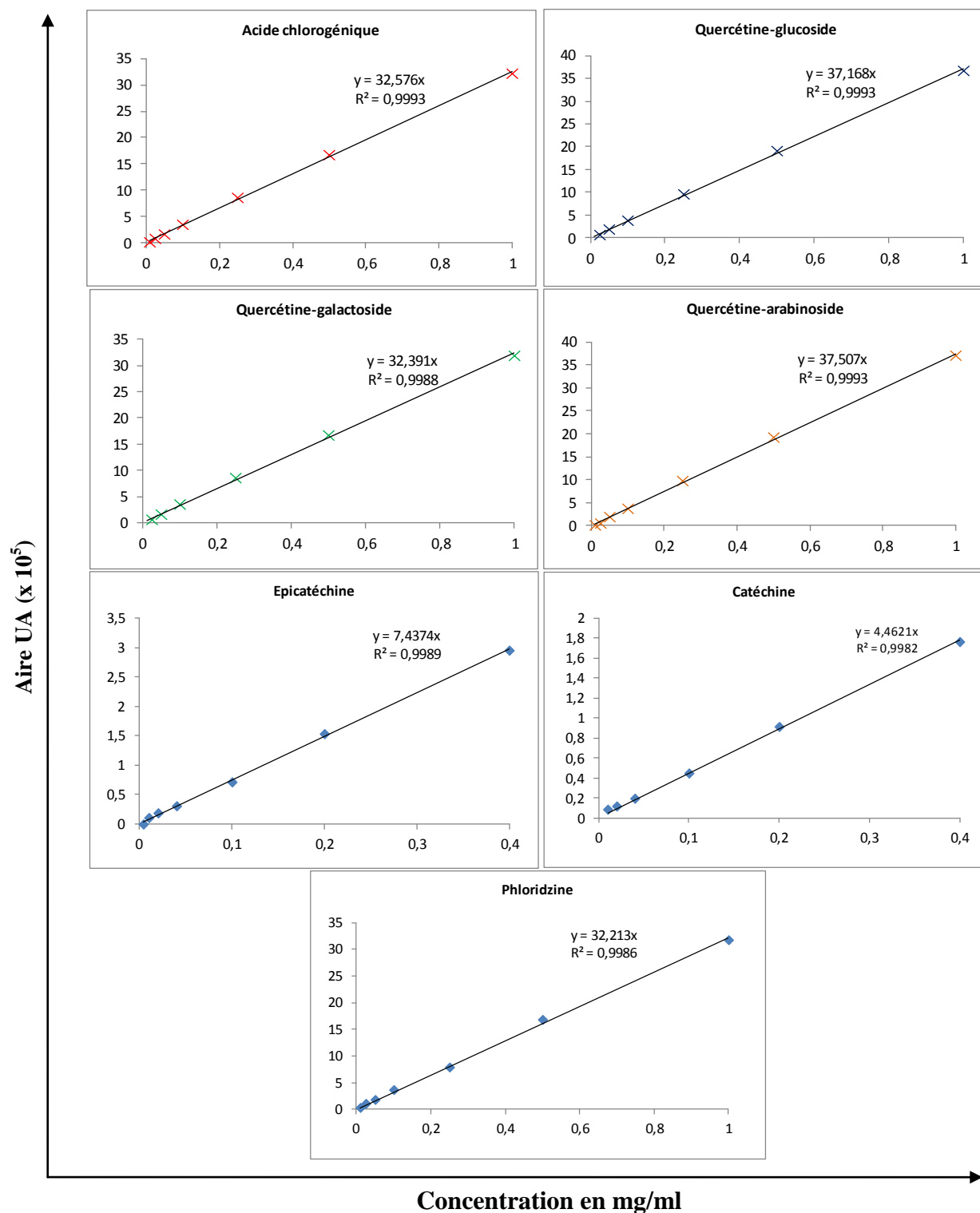
### ANNEXE 1. Droites étalons



*Figure 148 : Droite étalon de mesure de la capacité antioxydante selon la méthode TEAC. Pourcentage d'inhibition vis-à-vis de l'ABTS en fonction de la concentration de vitamine C (mg/L) (Spectrophotomètre THERMO, Helios γ)*



*Figure 149 : Droite étalon de dosage des polyphénols totaux selon la méthode Folin-Ciocalteu. DO à 760 nm en fonction de la concentration en acide gallique (g/L) (Spectrophotomètre Uvikon 933).*



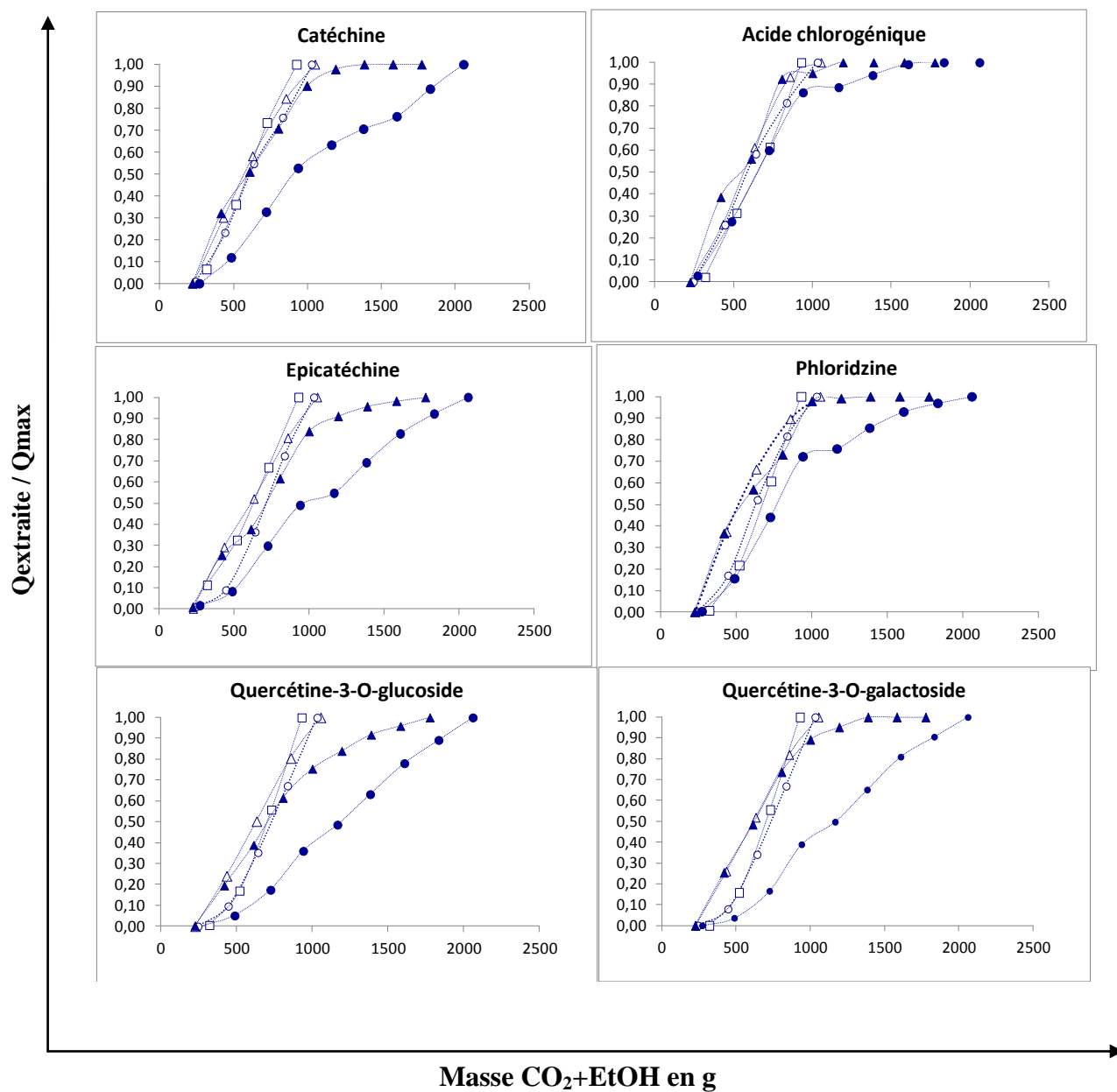
**Figure 150 :** Droite étalon de chaque polyphénol quantifié par CLHP (THERMO Accela) : acide chlorogénique, quercétine glucoside, quercétine galactoside, quercétine arabinoside, épicatechine, catéchine, phloridzine.

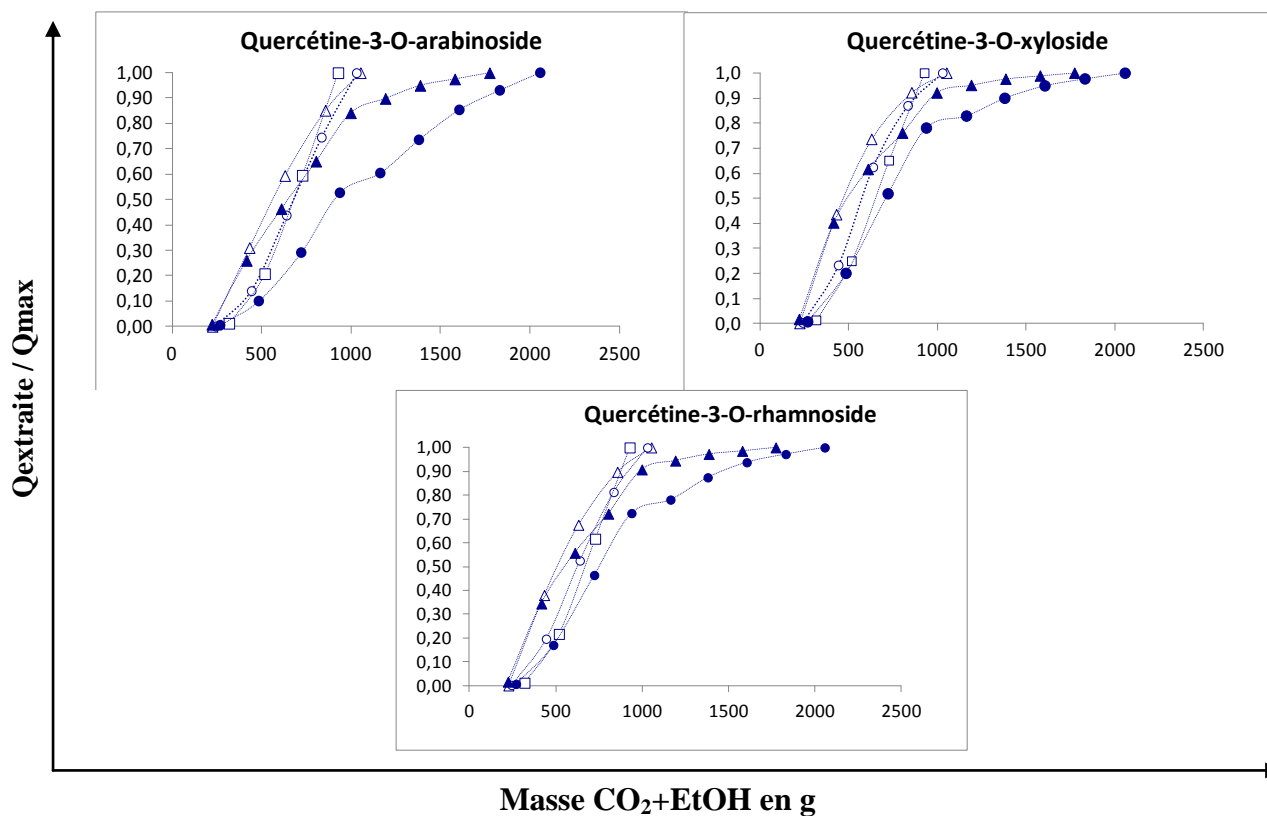
Les aires sont calculées par le logiciel CHROMQUEST, à 280 nm pour les polyphénols suivants : catéchine, épicatechine, acide chlorogénique et phloridzine, et à 350 nm pour les dérivés de quercétine.



## ANNEXE 2. Courbes d'extraction des polyphénols en FSC

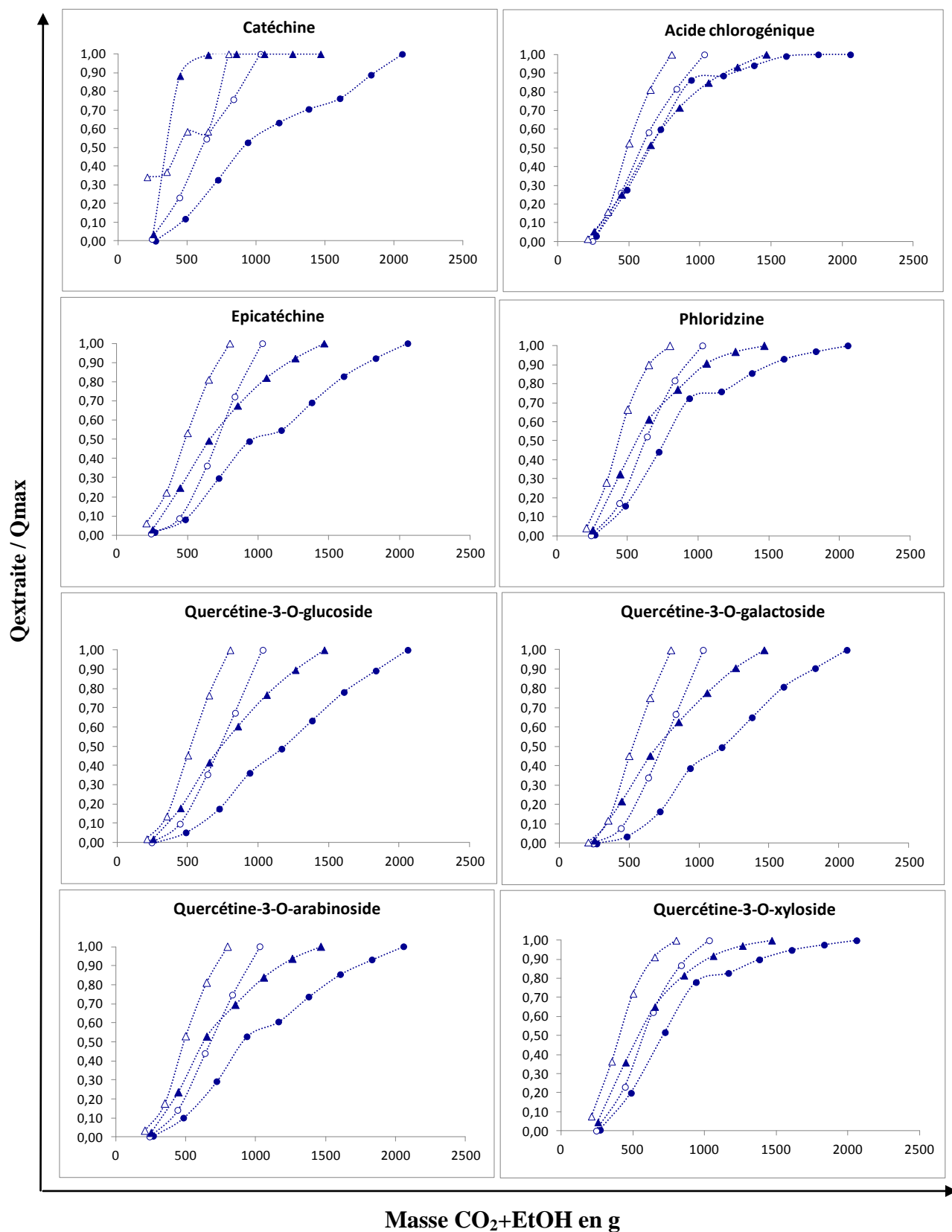
### 1. Influence de la masse d'épidermes chargée dans le réacteur.

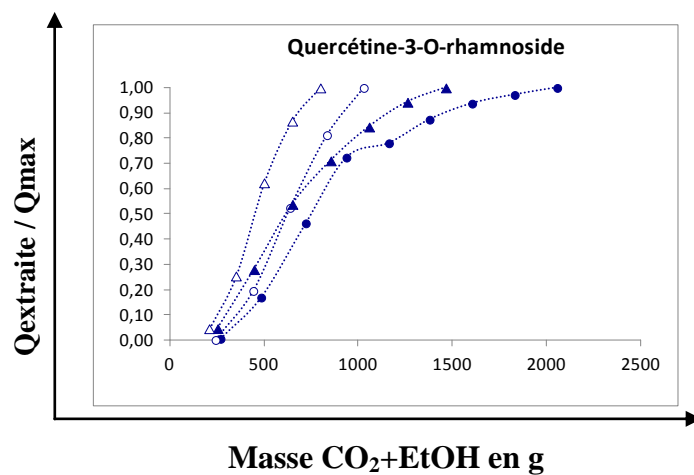




**Figure 151** : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols à 25 MPa, 50 °C et  $\text{CO}_2 + 25\% \text{ EtOH}$  ( $F_{\text{total}} = 9,7 \pm 0,8 \text{ g/min}$ ) ▲ EFS 12 - dynamique 15 g, ● EFS 9/11 - dynamique 30 g, ▲ EFS 15 - statique 15 g, ○ EFS 13/14 - statique 30 g, □ EFS 19 - statique 55 g.

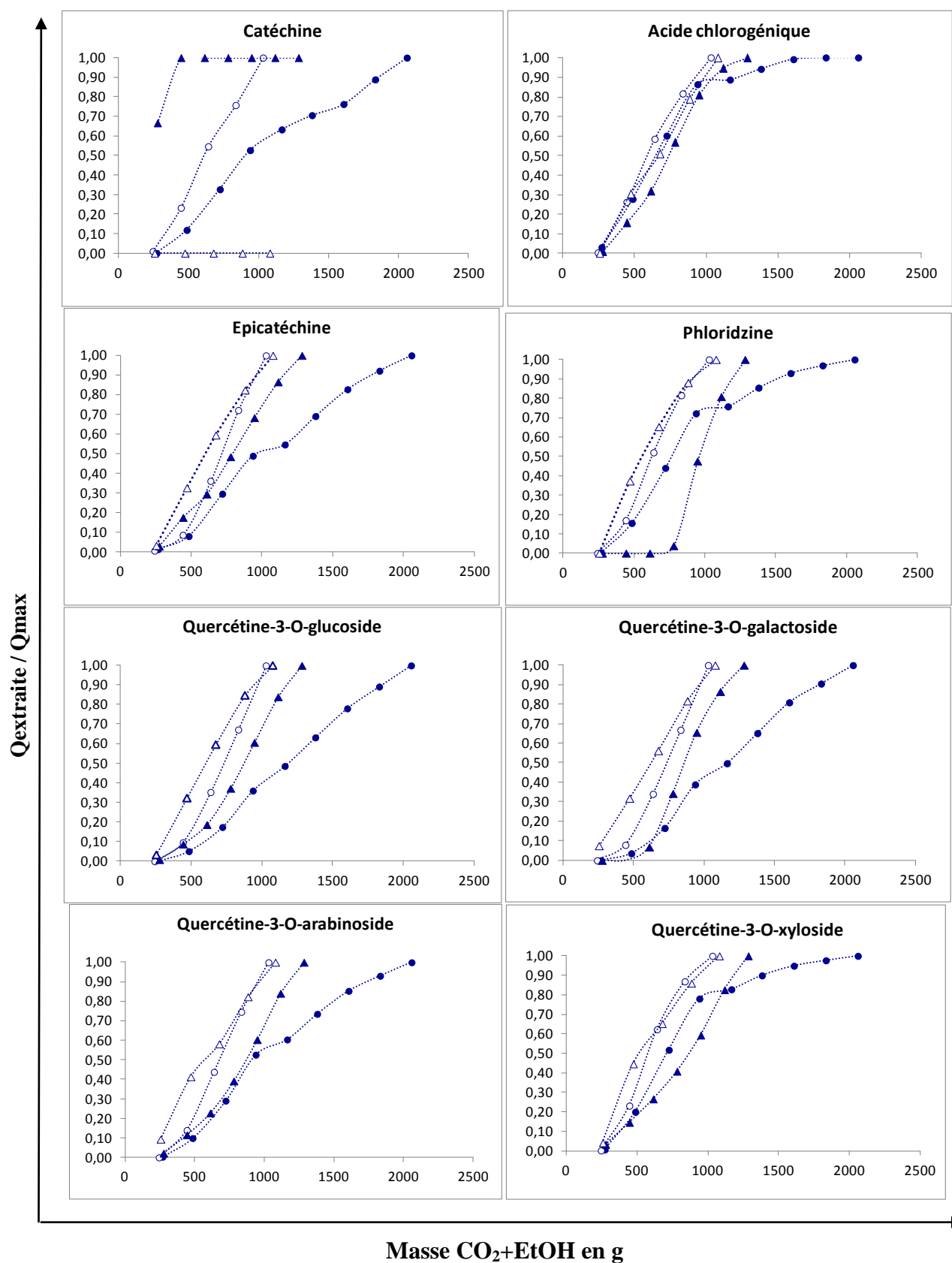
## 2. Broyage des épidermes.

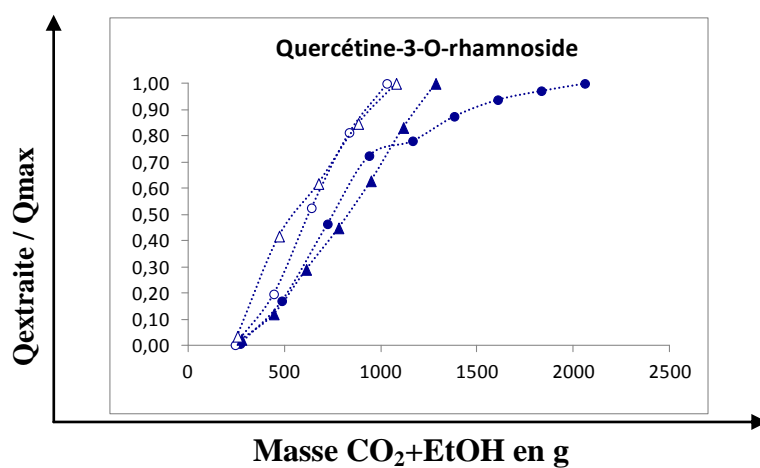




*Figure 152 : Cinétiques normalisées d'extraction CO<sub>2</sub>+25 % EtOH des polyphénols à 25 MPa, 50 °C, sur 30 g de pelures. ● EFS 9/11 - dynamique fin, ○ EFS 13/14 - statique fin, ▲ EFS 23 - dynamique grossier, △ EFS 26 - statique grossier.*

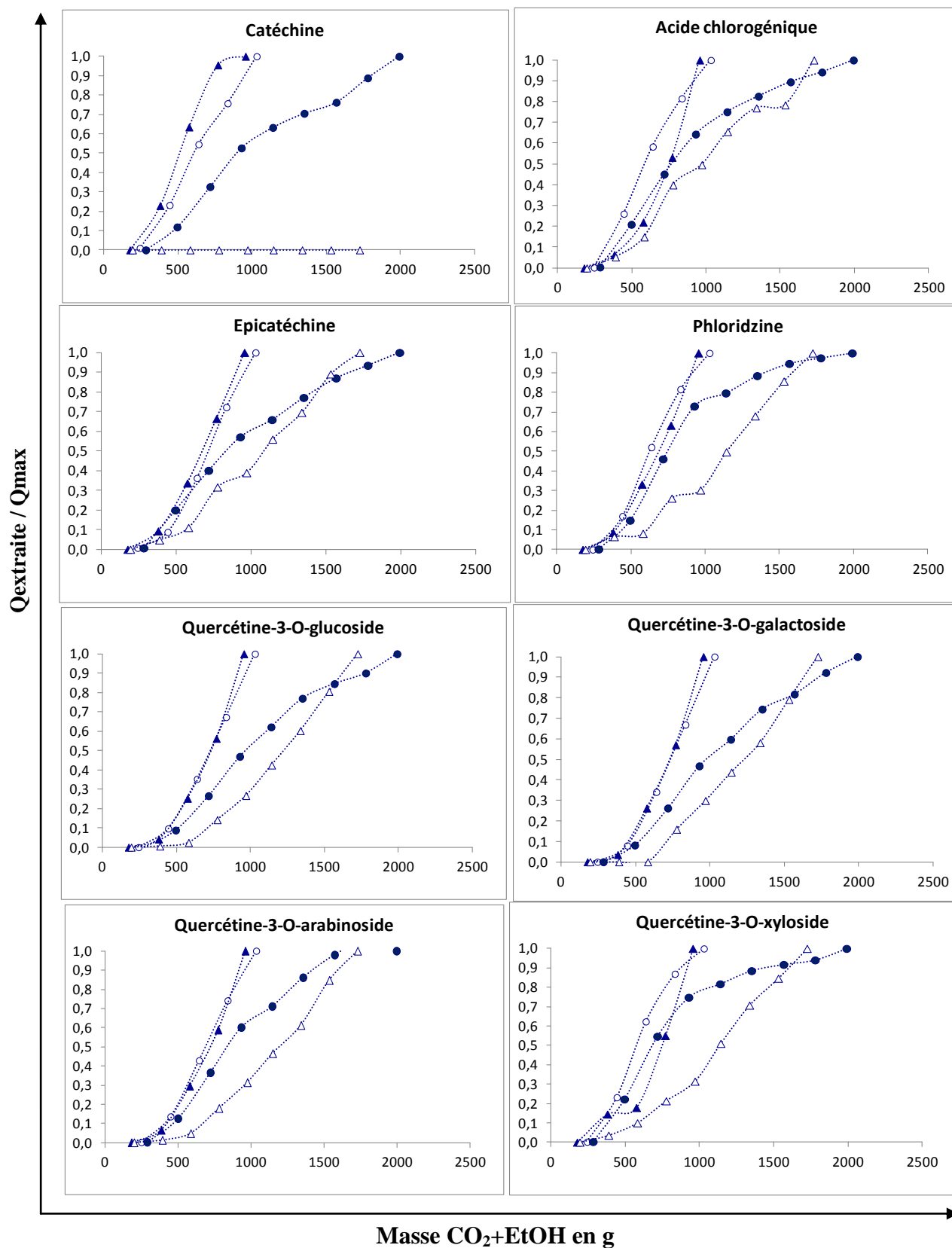
### 3. Blanchiment des matrices.

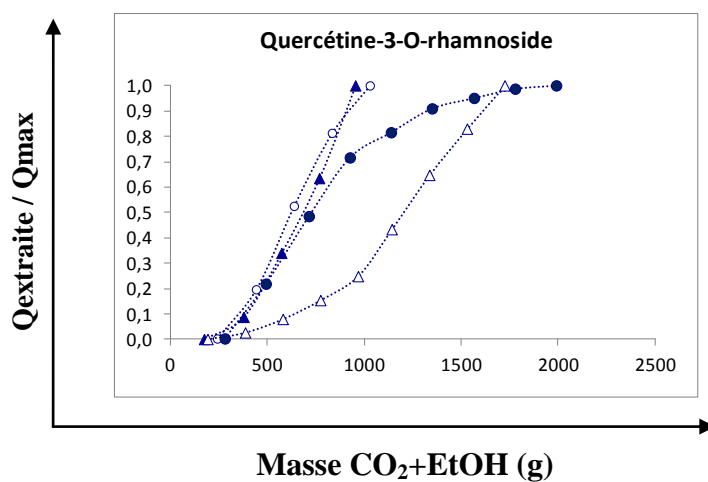




*Figure 153 : Cinétiques normalisées d'extraction CO<sub>2</sub>+25 % EtOH des polyphénols ● EFS 9/11 - dynamique, ○ EFS 13/14 - statique, ▲ EFS 28 - dynamique blanchi, △ EFS 27 - statique blanchi.*

#### 4. Influence de la température.

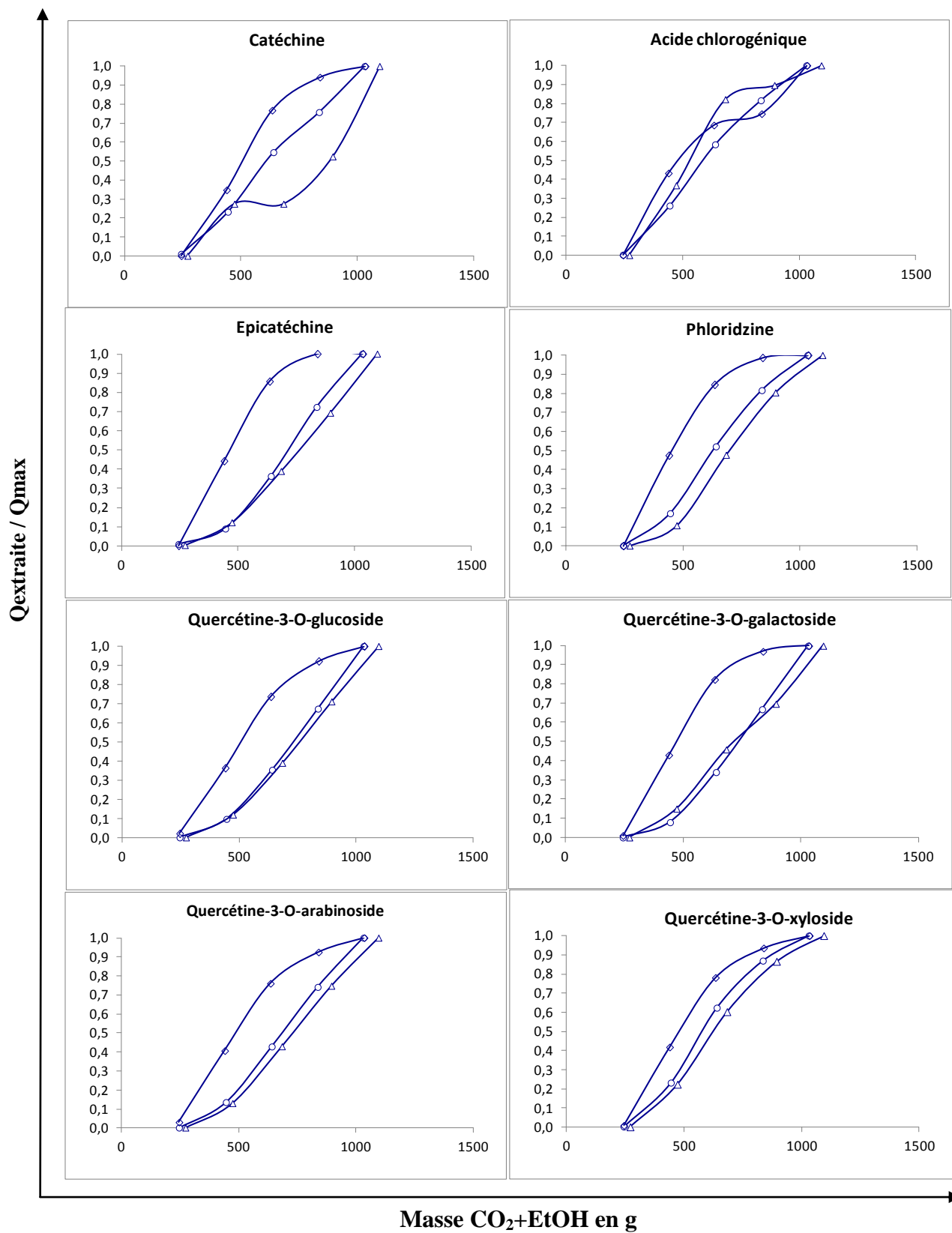


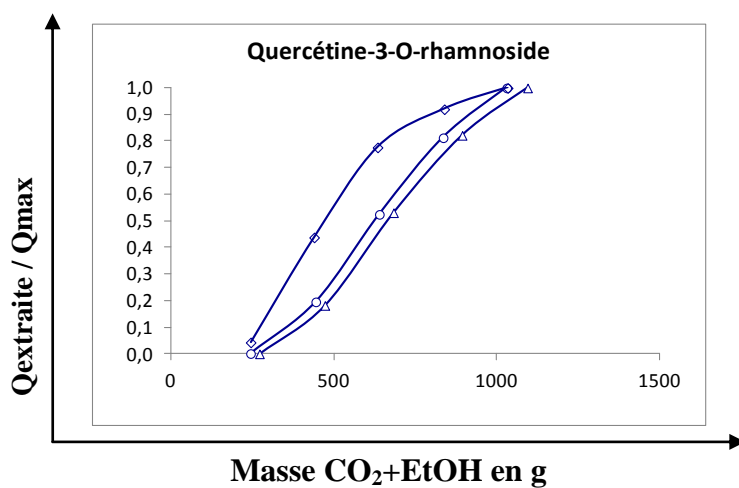


*Figure 154 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols obtenus par EFS à 28 °C ou 50 °C avec différentes composition de fluides, sur 30 g de pelures de pommes broyées, en fonction de la masse de fluide.  $\circ$  EFS 13/14 - statique à 50 °C,  $\blacktriangle$  EFS 10 - statique à 28 °C,  $\bullet$  EFS 9/11 - dynamique à 50 °C,  $\triangle$  EFS 20 - dynamique à 30 °C.*



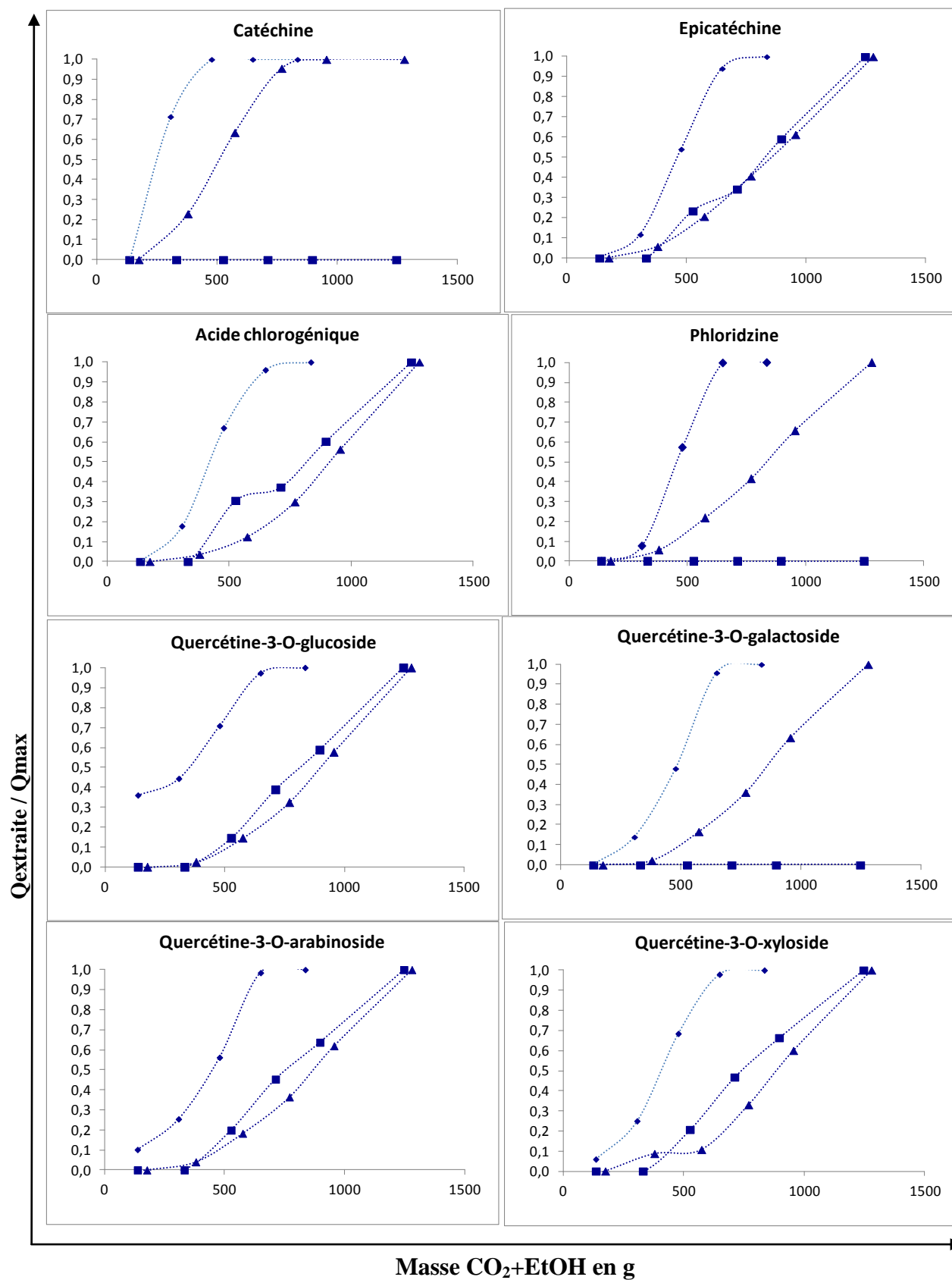
## 5. Influence de la composition du fluide à 50 °C.

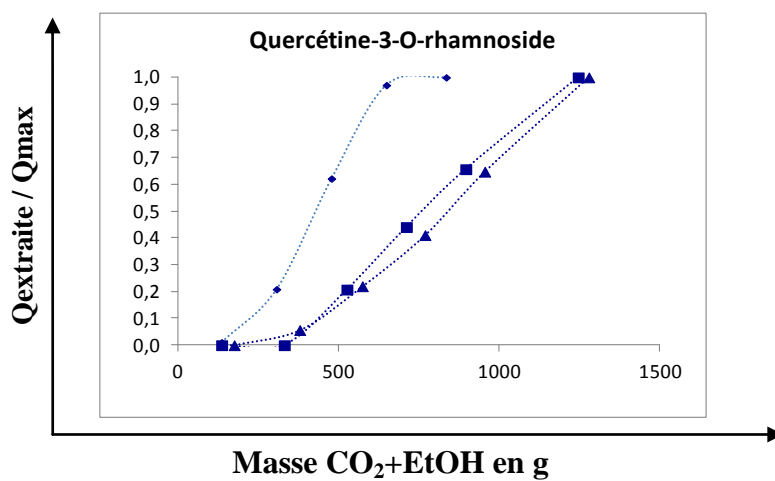




*Figure 155 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols à différentes compositions de fluide extractant, à  $T^\circ = 50^\circ \text{C}$ .  $\circ$  EFS 13/14 – 74:23:3 % molaire 30 g,  $\triangle$  EFS 17 – 72:19:9 % molaire 30 g  $\diamond$  EFS 18 – 50,4:43,5:6,1 % molaire 30 g.*

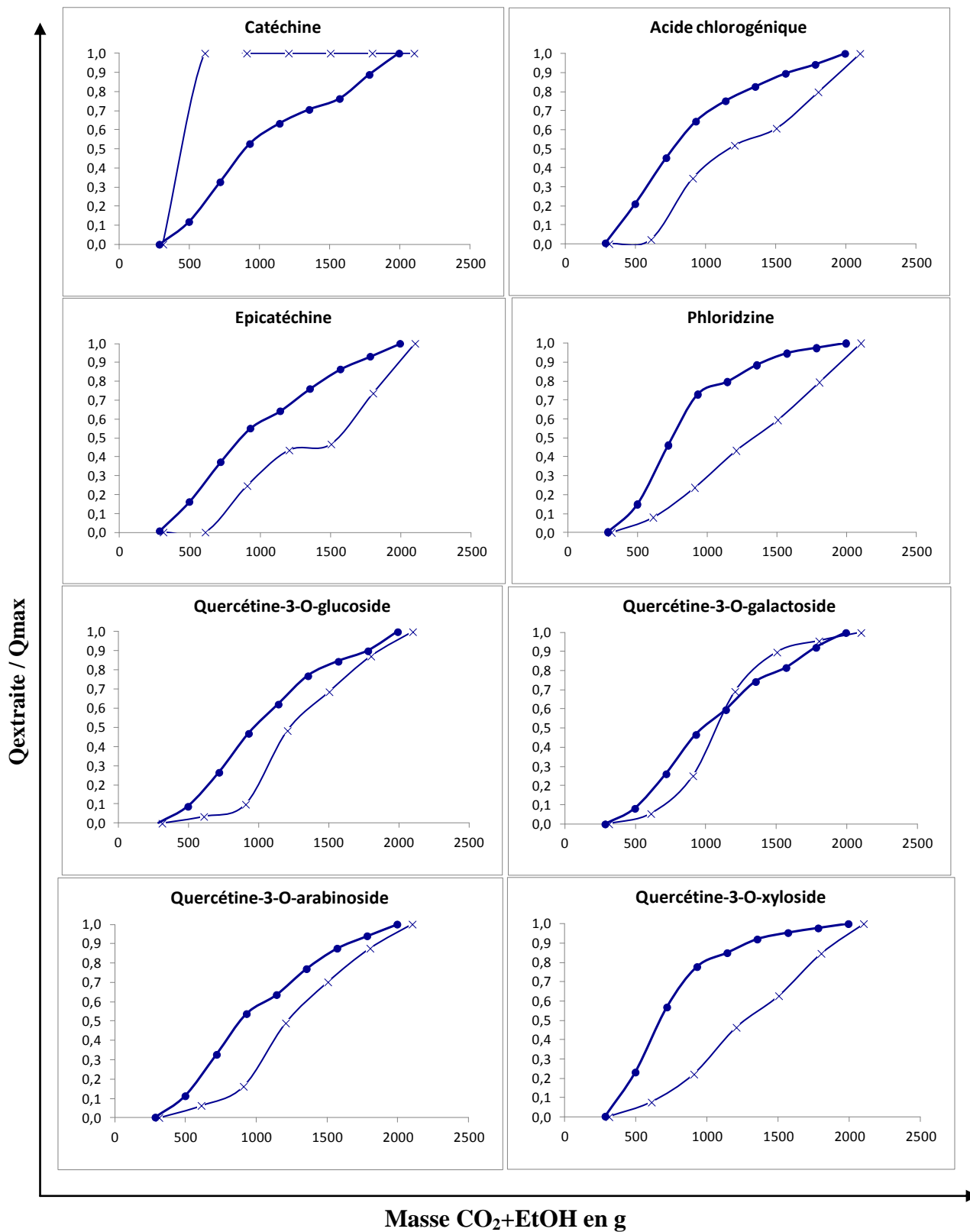
## 6. Influence de la composition du fluide à 28 °C.

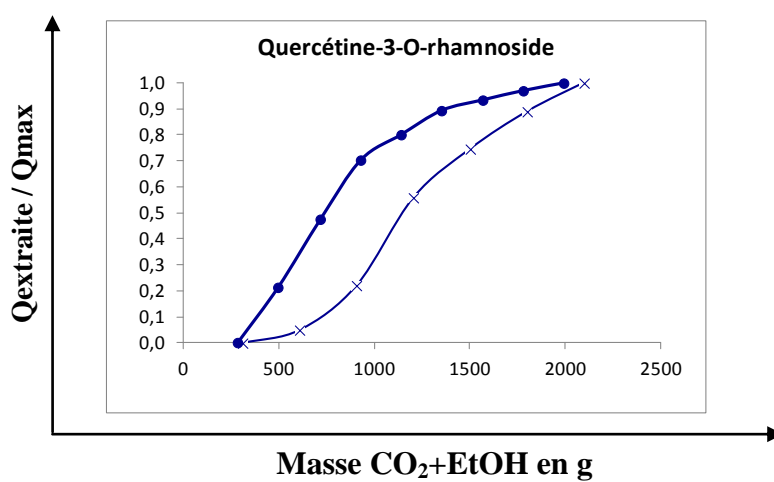




*Figure 156 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols à différentes compositions du fluide extractant, à  $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . ▲ EFS 10 – 74:23:3 % molaire 23 g, ■ EFS 22 – 49:45:6 % molaire 30 g, ◆ EFS 24 – 34:58:8 % molaire 30 g.*

## 7. Influence de la teneur en CO<sub>2</sub> (mode dynamique).





*Figure 157 : Cinétiques normalisées d'extraction des polyphénols à différentes compositions du fluide extractant. ● EFS 9/11 (76 % molaire de CO<sub>2</sub>), × EFS 29 (87 % molaire CO<sub>2</sub>)*

### ANNEXE 3. Communication scientifiques

Ce travail a donné lieu aux communications et à la publication suivante :

- **Massias A.**, Boisard S., Baccaunaud M., Leal Calderon F., Subra-Paternault P. (2014). Recovery of phenolics from apple peels using CO<sub>2</sub> + ethanol extraction: Kinetics and antioxidant activity extracts. *The Journal of Supercritical Fluids* 98: 172-182.
- **Duchêne A.**, Subra-Paternault P. (2014) Poster Valorization of apple by-products using CO<sub>2</sub> and cosolvent extraction. European Meeting on Supercritical Fluids, 18-21 may 2014, Marseille, France.
- **Duchêne A.**, Monteil J., Hadj Sassi A., Baccaunaud M., Leal Calderon F., Subra-Paternault P. (2013) Poster Propriétés antioxydantes d'extraits d'épidermes de pommes obtenus par fluides supercritiques et tests sur cellules *in vitro*. Health Ingredients Congress, 26-27 septembre 2013, Poitiers, France.





# **Valorisation fonctionnelle et antioxydante des épidermes de pommes *Golden Delicious*.**

## **Résumé**

Les pommes sont considérées comme bénéfiques pour la santé, de part leur teneur en polyphénols qui leur confèrent l'étiquette "d'aliment santé". Les procédés de transformation agroalimentaire des fruits et légumes génèrent des coproduits qui sont considérés comme sans valeur par les industriels. Or, au regard des volumes générés, ce sont des sources abondantes de nutriments.

Une voie possible de valorisation de ces coproduits est la réintroduction dans des produits alimentaires en tant qu'ingrédient, de façon à proposer des aliments enrichis en molécules fonctionnelles. Pour ce faire, deux voies ont été explorées: l'utilisation de poudres d'épidermes de pommes pour stabiliser une émulsion et l'extraction des polyphénols au moyen de la technologie à base de CO<sub>2</sub> supercritique. Ce travail examine également des solutions pour remédier au problème de brunissement enzymatique, comme le traitement thermique et l'addition de poudres de fruits naturellement riches en agents antibrunissement.

Les phases de préparation des pommes sont de réelles étapes de transformation qu'il faut optimiser et maîtriser afin de préserver toutes les propriétés antioxydantes des coproduits végétaux. Nos travaux ont également permis de mettre en évidence des propriétés plus fonctionnelles des pelures de pommes, comme agent stabilisant d'émulsions. L'impact des paramètres d'extraction a été mis en évidence par l'exploration de plusieurs conditions telles que la masse chargée, le broyage, le protocole ainsi que la température et la composition du fluide extractant.

## **Mots clés**

Coproduits, épidermes de pommes, composés phénoliques, émulsions, extraction par fluides supercritiques.

---

## **Functional and antioxidant valorization of apple peels *Golden Delicious*.**

### **Abstract**

Apples are considered beneficial to health, because of their content of phenolic compounds that confer the label "health food". Fruits and vegetables food processes generate byproducts that are considered worthless by industrial. However, given the volumes generated, they are rich sources of nutrients.

One possible way of valorization of these byproducts is the reintroduction of food as ingredient, to propose fortified foods with functional molecules. To do this, two approaches have been explored: the use of apple peels powders to stabilize an emulsion and the extraction of phenolic compounds by supercritical CO<sub>2</sub>+ethanol. This work also discusses solutions to remedy the enzymatic browning, such as heat treatment and the addition of naturally rich fruit powders as anti-browning agents.

Apples preparation phases are real transformation steps which it's necessary to optimize and master to preserve all the antioxidant properties of fruits and vegetables byproducts. Our works also highlight more functional properties of apple peels as a stabilizing emulsions agent. The impact of extraction parameters was demonstrated by the exploration of several conditions such as the loaded weight, the grinding, the protocol as well as the temperature and composition of supercritical fluids.

### **Keywords**

Byproducts, apple peels, phenolic compounds, emulsions, supercritical fluids extraction.

## **Unité de recherche**

**Institut de Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets - UMR 5248,  
Allée Geoffroy Saint Hilaire, Bât B14 - 33600 Pessac, France.**